

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

**DIE ZEITKINETIK DES SCHUTZES
NACH ORALER IMPFUNG
NACHGEWIESEN AM MODELL
DER DYSPEPSIECOLI-INFEKTION
DER WEISSEN MAUS**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Rudolf Steffen
aus Hemer-Westig**

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**DIE ZEITKINETIK DES SCHUTZES
NACH ORALER IMPFUNG
NACHGEWIESEN AM MODELL
DER DYSPEPSIECOLI-INFektion
DER WEISSEN MAUS**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Rudolf Steffen

aus Hemer-Westig

Referent: Prof. Dr. med. H. Raettig

Koreferent: Prof. Dr. med. B. Schmidt



**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin**

Promoviert am: 14. Juni 1973

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I	<u>Einleitung und Fragestellung</u>	7
II	<u>Material und Methoden</u>	10
	1. Versuchstiere	10
	2. Impfstoffherstellung	10
	3. Impftechnik	10
	4. Herstellung des Infektionsmaterials	11
	5. Infektionstechnik	11
	6. Auswertung	11
III	<u>V Versuchsergebnisse</u>	14
	1. Versuch 1	14
	2. Versuch 2	19
	3. Versuch 3	23
	4. Versuch 4	28
	5. Versuch 5	34
	6. Versuch 6	39
	7. Zusammenfassung der Einzelversuche	44
IV	<u>Diskussion</u>	50
	1. Schutzwirkung der Impfung	50
	2. Dauer des Impfschutzes	52
	3. Beginn des Impfschutzes	54
	4. Vergleich Mortalitätsversuch- Auftreten von immunkompetenten Zellen	57
	5. Phänomen der Frühsterblichkeit	58
V	<u>Zusammenfassung</u>	59
VI	<u>Literatur</u>	60

Einleitung

Es sind im wesentlichen zwei Modelle, an denen die Wirkungsweise der oralen Immunisierung studiert werden kann: das Modell der oralen Immunisierung gegen eine Infektion mit *S. typhi-murium* und das Modell der Immunisierung und Infektion mit *Dyspepsiecoli*-Keimen. LIETZ stellte in seiner Arbeit die Unterschiede zwischen diesen beiden Modellen heraus. (15).

Nach dem Grundversuch, einem Mortalitätsversuch, wie ihn RAETTIG für das Modell der *S. typhi-murium*-Infektion (36) und MOCHMANN für das der *Dyspepsiecoli*-Infektion (20) beschrieben, wurden immer feinere Methoden zur -bei der oralen Impfung schwierigen- Feststellung des Impferfolges und zur Klärung der Vorgänge, die zu einer Immunisierung führen, entwickelt, beispielsweise die Antikörpertitermessung (39,40,22,29), der Nachweis von immunkompetenten Zellen in der Lamina propria des Darmes (48), die Messung der Intestinalantikörper nach intraperitonealer Immunisierung (13) und die Beeinflussung der Phagozytosefähigkeit von Peritonealmakrophagen durch die orale Immunisierung (46). Vom Mortalitätsversuch bis zur Agar-Plaque-Technik wurde die Methodik komplizierter und aussagekräftiger.

Zahlreiche Autoren versuchten, durch Beantwortung von Einzelfragen den Wirkungsmechanismus der oralen Immunisierung besser verstehen zu lernen. Die von BESREDKA vertretene These von der alleinigen zellulären Immunität (1) läßt sich heute nicht mehr aufrechterhalten. MARWIK, SCHMUDDE, NEUMANN-SCHÖNWETTER und RAETTIG verglichen verschiedene lokale Impfmethode (Inhalation, nasal, rektal, oral) und kamen zu dem Ergebnis, daß alle untersuchten Schleimhäute beinahe gleichartig

auf die Antigenezufuhr reagierten (18, 17, 44, 27). LEFEVRE ging noch einen Schritt weiter und immunisierte Mäuse vergleichend intraperitoneal und oral (13). Er untersuchte die Intestinalantikörper und fand, daß nach intraperitonealer Immunisierung die Antikörpertiter sogar noch höhere Werte erreichten. Er folgerte daraus, daß auch die intraperitoneale Immunisierungsart eine Immunreaktion des Darmes auslöst, wie sie übrigens nach seinen und den Befunden anderer Autoren (4, 26) auf parenteralem Weg nicht erreicht werden konnte.

RAETTIG und BUSE wiesen nach, daß die orale Impfung die immunkompetenten Zellen stimuliert (39), rasch und spezifisch zu reagieren. ROSSETINI, LEVANON und RAETTIG fanden nach oraler Immunisierung immunkompetente Zellen im Darm (42). MOCHMANN und OCKLITZ stellten fest, daß die Wirkung der DC-Impfung gruppenspezifisch ist (21).

Andere Autoren verfolgten den Weg des Antigen im tierischen Organismus. PETER (32) verfütterte Colikeime und konnte sie nur bis zu 6 Stunden nach der Verfütterung in Herz, Leber und Milz nachweisen, im Gegensatz zu den auch verfütterten Salmonellen. UECKER und Mitarbeiter (47, 19) markierten Bakterien radioaktiv und stellten schon nach Minuten Aktivitäten im strömenden Blut fest. Dabei wurde das Antigen nur teilweise aufgenommen, schnell ausgeschieden, im RES gespeichert und in etlichen Drüsen sezerniert.

Neben der Klärung dieser mehr akademischen Interessen ist das Endziel aller Bemühungen um die orale Immunisierung die Entwicklung oraler Impfstoffe für Mensch und Tier. RAETTIG wies mehrfach darauf hin, daß infektiöse Darmerkrankungen wohl nur durch eine lokale Immunisierung wirksam verhindert werden können (34, 35, 9).

So wurden die jüngsten Ergebnisse über die orale Immunisierung von einigen Arbeitsgruppen auf andere Tierarten und den Menschen übertragen. BISPING und DIMITRIADIS beispielsweise beschäftigten sich mit der oralen Immunisierung von Hühnern gegen eine Salmonelleninfektion (3, 5), HÖRTER immunisierte Tauben gegen die Salmonellose (7, 8), LEMKE untersuchte die Antikörper gegen Typhus und Paratyphus bei Menschen und Kälbern (14).

Besonders dringlich scheint eine Prophylaxe der Dyspepsiecoli-Infektion, wie OCKLITZ und MOCHMANN bewiesen (31). Danach verstarben im Jahre 1965 in der DDR von insgesamt 6960 Säuglingen 820 an einer Ernährungsstörung oder an einer toxischen Dyspepsie. Wenn auch eine weitere Aufschlüsselung dieser letztgenannten Zahl nicht möglich war, kann eine Wertung trotzdem erfolgen, da von den Bakterien, die eine Enteritis hervorrufen, die Dyspepsiecoli die häufigsten sind.

Nachdem etliche Versuche mit der DC-Impfung an der weißen Maus ein hervorragendes Ergebnis zeigten, machten diese Autoren und SCHREIBER Feldversuche, über die sie ausführlich berichteten (45, 25, 30).

Schon früher untersuchten MOCHMANN und OCKLITZ die Dauer der Schutzwirkung der oralen DC-Impfung (23), wobei sie die Intervalle zwischen den einzelnen Infektionstagen recht groß wählten. Ich wollte neben Dauer und Größe des Infektionsschutzes auch überprüfen, wann der Impfschutz einsetzt und wie schnell die Versuchstiere belastet werden können. Als Maß für die Größe des Impfschutzes galt der Wirkungsindex (=WI).

Zusätzlich versuchte ich noch zu klären, ob die Ergebnisse von WERNER über die immunkompetenten IgM-bildenden Zellen (48) auch im Mortalitätsversuch bestätigt werden konnten.

Material und Methoden

Mäuse: Für die einzelnen Versuche wurden insgesamt über 3000 Mäuse vom NMRI (= Naval Medical Research Institute) -Stamm verwendet. Die weißen Inzuchtmäuse wurden zu je 25 Stück in Plastikkäfigen gehalten und mit "Altromin" und Leitungswasser ernährt. Zu Beginn jedes Versuches wogen sie 14 bis 15 Gramm.

Impfstoffherstellung: Mehrere große Agarplatten wurden mit E.coli 2380 (ROWLEY, 43) beschickt und für 24 Stunden bei 37° C im Brutschrank belassen. Der gewachsene Bakterienrasen wurde mit sterilen Glasspateln vom Agar getrennt und die so erhaltene Bakteriensuspension zentrifugiert. Danach wurde dreimal mit gepufferter physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und jeweils 1 Stunde lang bei 6000 U/min zentrifugiert. Das Material wurde auf 10^9 Keime / ml eingestellt und in kleinen Portionen 3 Minuten lang bei 100° C im Wasserbad inaktiviert (12).

Impftechnik: Das Ziel dieser Arbeit, Beginn, Dauer und Größe des Impfschutzes gegen eine Infektion mit Dyspepsiecoli-Bakterien zu verfolgen, machte es erforderlich, von dem bisher von RAETTIG und Mitarbeitern angewandten Impfschema abzuweichen (36, 38, 15, 16). Hier wurden die Mäuse einmal bis zu zehnmal immunisiert. Sie bekamen in Portionen von 0,25 ml den Impfstoff mittels Schlundsonde verfüttert. Die Mäuse erhielten zur oralen Immunisierung also Gesamtkeimzahlen, die je nach dem Infektionstag zwischen $2,5 \times 10^8$ und $2,5 \times 10^9$ schwankten. Die Impfung wurde von allen Mäusen ohne eine sichtbare Reaktion vertragen.

Infektionsmaterial: Am Tag der Infektion wurden zwei Ösen Bakterienmaterial (E.coli 2380) in 50 ml Bouillon überimpft und für 5 Stunden bei 37⁰ C bebrütet. Anschließend wurde eine Keimzählung durchgeführt.

Infektionstechnik: Die Mäuse wurden homolog mit E.coli 2380 intraperitoneal infiziert. LIETZ und RAETTIG, OCKLITZ, MOCHMANN und Mitarbeiter beschrieben bereits mehrfach die gute Wirkung dieser Infektionsart am Modell von E.coli 2380 (15, 16, 20, 28). Jeder Maus wurde 0,1 ml des Infektionsmaterials injiziert, dessen durchschnittliche Keimzahl $5,97 \times 10^8$ Keime/ml betrug, berechnet als Durchschnitt aus allen Versuchen. Bis auf ganz wenige Ausnahmen gingen alle erkrankten Tiere innerhalb von drei Tagen an einer foudroyant verlaufenden Erkrankung zugrunde.

Auswertung: Die Versuchsergebnisse wurden zunächst für jeden Versuch getrennt in einer Tabelle und drei Zeichnungen festgehalten.

In der Tabelle kann man neben den Mortalitäten der Versuchs- und Kontrolltiere ablesen, wieviel Tiere an welchem Tag der Infektion erlegen sind. Der Wirkungsindex WI ermöglicht eine Beurteilung der Größe des Impfschutzes. Er errechnet sich nach der Formel $WI = \frac{(b-a) \times 100}{b}$, wobei b die Mortalität der nichtgeimpften, a die Mortalität der geimpften Tiere ist. Der Echtheitsgrad E ermöglicht eine Aussage darüber, ob der Impferfolg bei einer bestimmten Anzahl von Tieren als statistisch gesichert angesehen werden kann. Man berechnet ihn nach der Formel $E = \frac{Db}{Dz}$, wobei Db die beobachtete Differenz der Mortalitäten (also b-a), Dz die größte erlaubte Zufallsdifferenz ist. Dz wird für

die jeweilige Tierzahl und für die Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % aus den statistischen Tafeln von KOLLER ermittelt (10). Wenn Db größer oder gleich Dz ist, wenn E also den Wert 1 erreicht oder ihn übertrifft, darf das ermittelte Ergebnis als statistisch gesichert angesehen werden.

Von den möglichen zeichnerischen Darstellungen wählte ich für jeden Versuch drei Kurven aus. Die Kurve des Wirkungsindex (Abszisse: Tage nach Ende der Immunisierung; Ordinate: WI) ermöglicht eine Aussage über Größe, Dauer und Verlauf des Impfschutzes. Die Summenkurve der Mortalität (Abszisse: Tage post inf.; Ordinate: Mortalität in % von Versuchs- und Kontrolltieren) erlaubt die Größe des Impfschutzes und die Absterbeordnung zu beurteilen. Letzteres kann - in deutlicherer Form - auch durch die Indexkurve der Mortalität (Abszisse: Tage post inf.; Ordinate: Mortalitätsindex) geschehen. Dabei wird die Endmortalität von Versuchs- und Kontrolltieren, die normalerweise am dritten Tag nach der Infektion erreicht wird, gleich 100 gesetzt und dann auf die übrigen Werte umgerechnet.

Nach der Besprechung der Einzelergebnisse der Versuche wurden die ermittelten Werte tabellarisch und graphisch zusammengefaßt.

Auf eine Besonderheit sei an dieser Stelle noch hingewiesen: In anderen Arbeiten wurden stets die Infektionstage vom Ende der Immunisierung an berechnet. Das war auch gut möglich, weil man eine feste Zahl von Immunisierungstagen einplante und die Tiere immer nach dieser Zeit infizierte. In meinen Versuchen wurde nun von diesem Schema abgegangen; ich infizierte die Mäuse auch schon innerhalb der Immunisierungszeit. Um Mißverständnisse zu vermeiden, bin ich bei der alten Zeiteinteilung geblieben,

habe aber die Tage während der Immunisierungszeit als "Minus-tage" bezeichnet. Danach wäre der erste Tag der Immunisierung der-11.Tag, der letzte Tag einer zehntägigen Immunisierungsperiode der 0. Tag und der erste Tag nach Ende der Immunisierung der 1. Tag wie bisher schon immer üblich.

Ergebnisse

1. Versuch: Der 1. Versuch, der Grundversuch an 497 Mäusen, begann am 1. 3. 71 und dauerte 30 Tage. 347 Mäuse waren immunisierte Versuchstiere, 150 nicht immunisierte Kontrolltiere. Die Kontrollen wurden am 11. Tag, am 5. Tag und am 18. Tag intraperitoneal infiziert, die Versuchstiere am -8., am -4., am -1., 5., 6., 7. und 18. Tag belastet. Die ersten drei Infektionen der Versuchstiere fielen also in die zehnmalige Immunisierungsperiode hinein: die drei Tiergruppen wurden nach nur dreimaliger, fünfmaliger und achtmaliger Immunisierung infiziert, wobei der Schutz schon Stunden später geprüft wurde. Die restlichen vier Gruppen infizierte ich nach vollständiger zehnmaliger Immunisierung, dabei lag der Unterschied zu den meisten Arbeiten von OCKLITZ, MOCHMANN und Mitarbeitern sowie zu der Arbeit von LIETZ also darin, daß in meiner Versuchsanordnung die Intervalle zwischen letztem Immunisierungstag und den Infektionstagen verschieden lang gewählt wurden (15, 16, 20).

Die durchschnittliche Keimzahl des Infektionsmaterials für diesen ersten Versuch betrug $5,8 \times 10^8$ Keime/ml.

Die Tabelle 1 und die Abb. 1, 2 und 3 geben das Ergebnis dieses Versuches wieder. Die Mäuse waren nach einer mehrmaligen Impfung mit hitzeinaktivierten E.coli 2380 und einer nachfolgenden homologen intraperitonealen Infektion hochgradig geschützt, wie die hohen Wirkungsindices zeigten (Tab. 1, Sp. 15), die in keinem Fall unter 82 lagen. Alle Werte waren statistisch signifikant (Tab. 1, Sp. 16).

Überrascht aber war ich von dem Ergebnis, daß der Impfschutz schon so schnell und in so großem Maße einsetzte. Erwartet

Tabelle 1

Vers.- Tag	Zeile	Versuch		gestorben am					Kontrolle		gestorben am					WI	E
		lebend/ tot	Mort. %	1.	2.	3.	4.	5.	lebend/ tot	Mort. %	1.	2.	3.	4.	5.		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-11	1	-/-	-	-	-	-	-	-	50/31	62,0	26	4	1	-	-	-	-
-8	2	50/4	8,0	2	2	-	-	-								87,1	>1
-4	3	49/3	6,1	3	-	-	-	-								90,2	>1
-1	4	50/0	0	-	-	-	-	-								100,0	>1
5	5	50/1	2,0	1	-	-	-	-	50/29	58,0	20	8	1	-	-	96,6	>1
6	6	50/2	4,0	2	-	-	-	-								93,1	>1
7	7	50/2	4,0	2	-	-	-	-								93,1	>1
18	8	48/5	10,4	5	-	-	-	-	50/29	58,0	21	8	-	-	-	82,1	>1
Summe	9	347/17	4,9	15	2	-	-	-	150/89	59,3	67	20	2	-	-	91,7	4,1

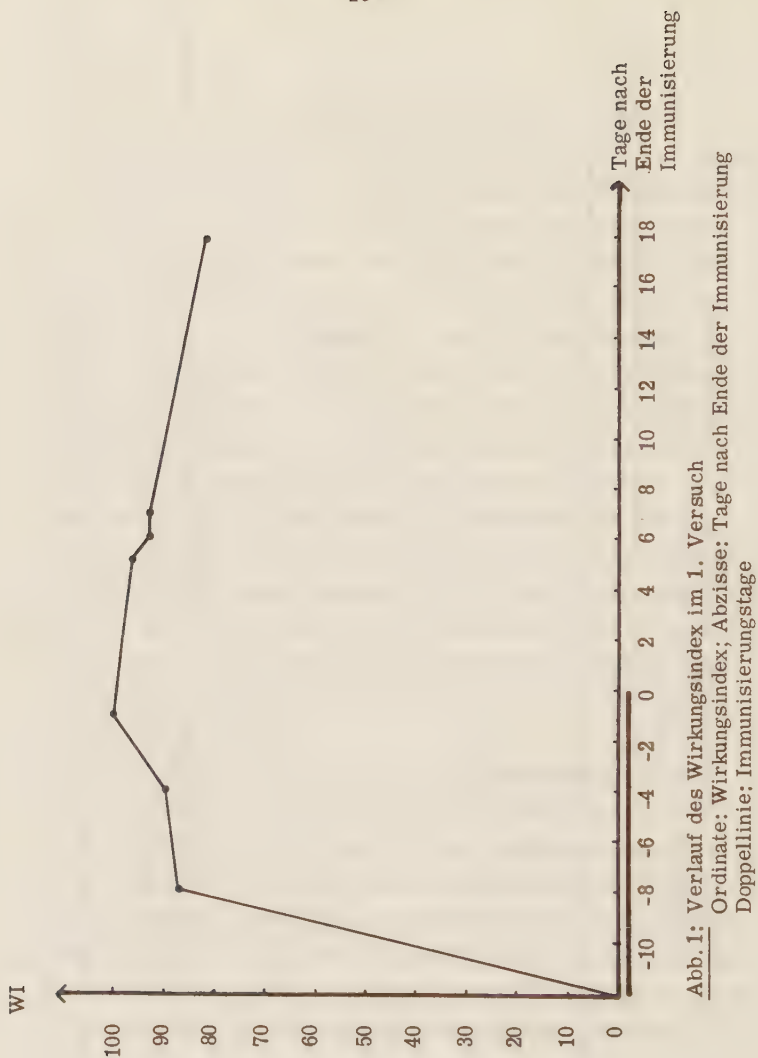
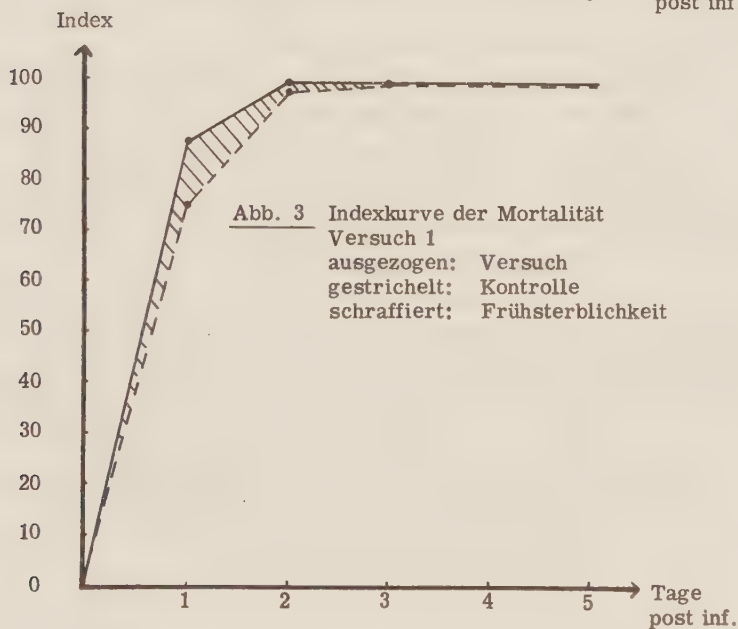
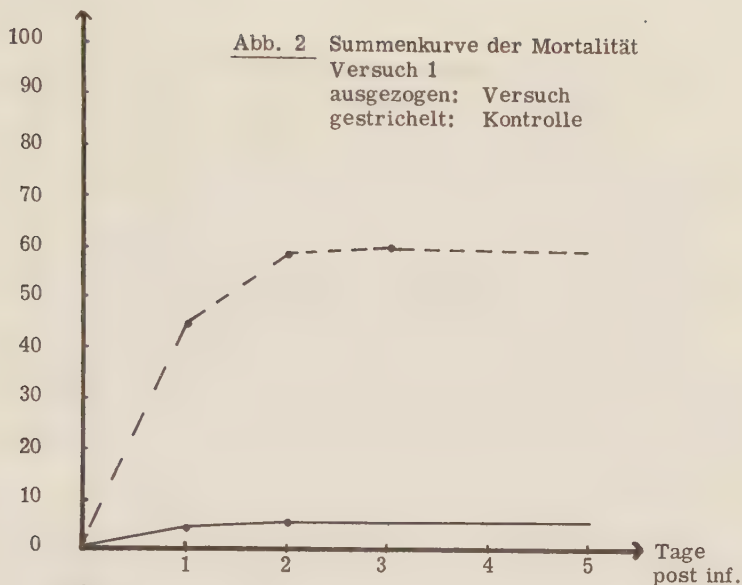


Abb. 1: Verlauf des Wirkungsindex im 1. Versuch

Ordinate: Wirkungsindex; Abzisse: Tage nach Ende der Immunisierung
Doppellinie: Immunisierungstage

Mortalität
%

- 17 -



hatte ich, daß der Schutz nach Ende der Immunisierung langsam ansteigen würde. Wie die Tabelle 1 zeigt, erzielte ich aber schon nach nur dreimaliger Immunisierung einen Wirkungsindex von 87, 1, der sich nach weiteren Gaben des Antigen sogar auf 100 nach achtmaliger Immunisierung steigerte.

Der Impfschutz verringerte sich danach nur unwesentlich und erreichte am 18. Tag für diesen Versuch sein Minimum.

Tab. 1 Zeile 9 zeigt die Summenwerte dieses ersten Versuches. Einer Mortalität von 4,9 % bei den Versuchstieren stand eine Mortalität von 59,3 % bei den Kontrollen gegenüber. Dementsprechend hoch war der Wirkungsindex mit 91,7. Der Echtheitsgrad betrug 4,1.

Die Verlaufskurve des Wirkungsindex (Abb. 1) entspricht den Ergebnissen, die oben an Hand der Tab. 1 besprochen wurden. Der WI stieg innerhalb der Immunisierungszeit steil bis zum Maximum an und fiel dann ganz allmählich bis zum 18. Tag ab.

Die Summenkurve der Mortalität (Abb. 2) erlaubt einen direkten Vergleich der Mortalitäten von Versuchs- (=ausgezogene Linie) und Kontrolltieren (=gestrichelte Linie). Der Abstand beider Kurven verdeutlicht den guten Schutz, den die Impfung den Versuchstieren vermittelte. Sie zeigt aber auch, daß von den Versuchstieren fast alle der Infektion bereits am ersten Tag erlagen, während bei den Kontrolltieren die Endmortalität erst nach drei Tagen erreicht wurde. Im Gegensatz zu den geimpften Tieren zog sich bei den nicht geimpften Kontrolltieren die Erkrankung länger hin. Dieses Phänomen der Frühsterblichkeit beschrieben RAETTIG und KORDES schon früher (36, 11, 12).

Es tritt deutlicher hervor in der Indexkurve der Mortalität, bei der die Endmortalitäten von Versuchs- und Kontrolltieren gleich 100 gesetzt wurden (Abb. 3). Die Kurve für die Versuchstiere liegt hier in den ersten Tagen deutlich über der der Kontrollen.

2. Versuch: Mit diesem Versuch, der 40 Tage dauerte, begann ich am 15.3.71. Ich benötigte dafür insgesamt 498 Mäuse, von denen wiederum 150 Kontrolltiere waren, die nicht geimpft wurden. Dieser Versuch war länger als der erste. Darüberhinaus wurden die Infektionstage anders gewählt, wobei aber innerhalb der Immunisierungsperiode die Tiere unverändert am -8., -4. und -1. Tag infiziert wurden, um die guten Resultate des ersten Versuches zu bestätigen. Die Kontrolltiere wurden am -11., am 5. und am 28. Tag i.p. infiziert, die geimpften Tiere nach Ende der Immunisierung am 5., 14., 18. und 28. Tag. Die Keimzahl des Infektionsmaterials betrug durchschnittlich $6,1 \times 10^8$ Keime/ml.

Wie die Tabelle 2 und die Abbildungen 4-6 verdeutlichen, wurden die überraschenden Resultate des ersten Versuches bestätigt: Wieder war der Impfschutz bereits nach dreimaliger Immunisierung mit einem Wirkungsindex von 77,8 recht hoch, und er zeigte wieder die Tendenz zum Maximum am -1. Tag. Hier, wie dann auch am 5. Tag, betrug der WI sogar 100. Alle Ergebnisse waren signifikant (Tab.2, Zeilen 2-5).

Der weitere Verlauf des WI unterschied sich dann aber doch etwas von dem des 1. Versuches. Am 14. Tag, der im Versuch 1 nicht vertreten war, erzielte ich mit einer Mortalität von 26 % bei den Versuchstieren das schlechteste Ergebnis dieses 2. Versuches. Der WI sank von 100 auf 62,9. Der Impfschutz stieg dann aber wieder an, wie sich an den Wirkungsindices ablesen läßt (Spalte 15). Auch am 28. Tag nach Ende der Immunisierung, also dem 40. Versuchstag, betrug der WI noch 88,3.

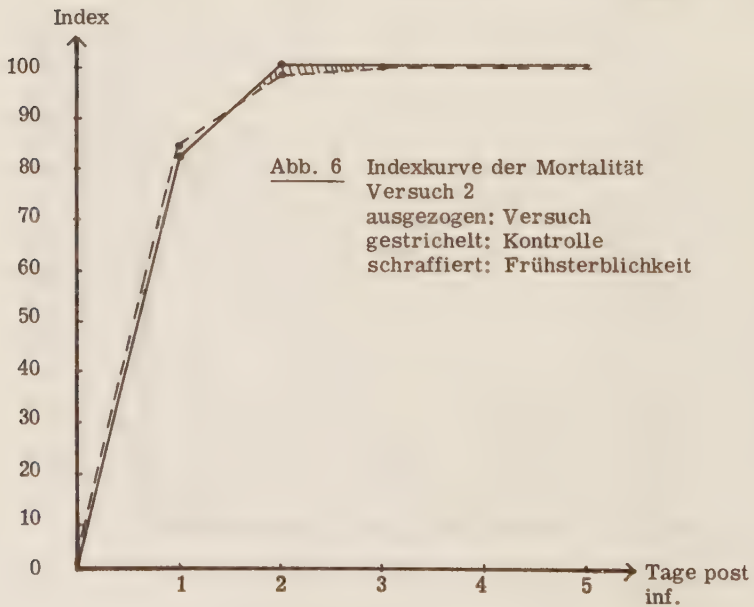
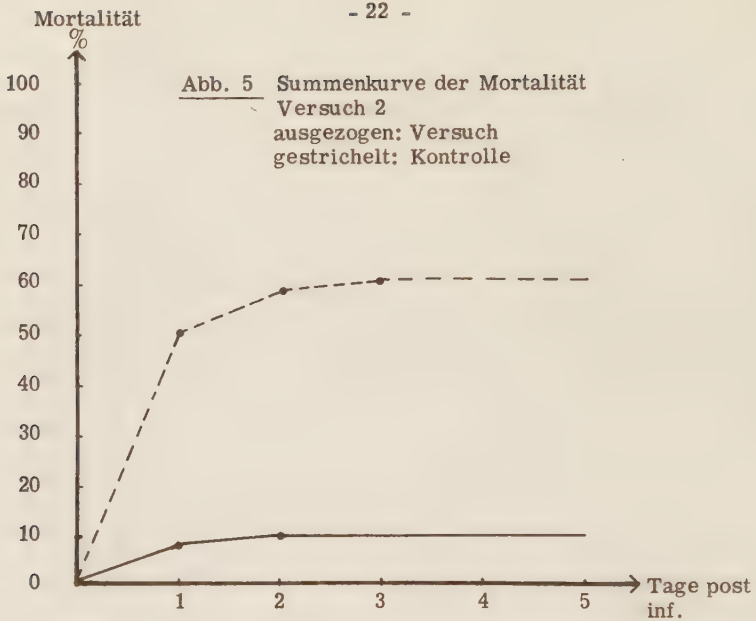
Das Gesamtergebnis des 2. Versuches, das sich aus der Tab.2, Zeile 9 ablesen läßt, war nur unbedeutend schlechter als das des Versuches 1. Von den 348 Versuchstieren starben 32

Tabelle 2

Vers.- Tag	Zeile	Versuch lebend/Mort. tot %	gestorben am 1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.					Kontrolle lebend/Mort. tot %	gestorben am 1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.					WI	E		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-11	1	-/-	-	-	-	-	-	-	50/27	54,0	20	6	1	-	-	-	-
-8	2	50/6	12,0	4	2	-	-	-								77,8	>1
-4	3	50/1	2,0	1	-	-	-	-								96,3	>1
-1	4	50/0	0	-	-	-	-	-								100,0	>1
5	5	50/0	0	-	-	-	-	-	50/35	70,0	33	2	-	-	-	100,0	>1
14	6	50/13	26,0	10	3	-	-	-								62,9	>1
18	7	50/9	18,0	9	-	-	-	-								74,3	>1
28	8	48/3	6,3	2	1	-	-	-	50/27	54,0	21	5	1	-	-	88,3	>1
Summe	9	348/32	9,2	26	6	-	-	-	150/89	59,3	74	13	2	-	-	84,5	3,8



Abb. 4: Verlauf des Wirkungsindex im 2. Versuch
 Ordinate: Wirkungsindex; Abszisse: Tage nach Ende der Immunisierung
 Doppellinie: Immunisierungstage



(= 9,2%), von den 150 Kontrolltieren aber 89 (= 59,3%), was einem WI von 84,5 bei einem Echtheitsgrad von 3,8 entsprach. Auffällig war noch, daß die Mortalität der Kontrolltiere stärker schwankte als im 1. Versuch.

Abb. 4 zeigt den Verlauf des Wirkungsindex gegenüber der Zeit. Wie besprochen ähnelte die Kurve im Anfangsteil der Abb. 1; charakteristisch war im weiteren Verlauf die Senkung am 14. Tag und das folgende langsame Ansteigen bis zum 28. Tag, wobei jedoch der Wert 100 nicht wieder erreicht wurde.

Abb. 5 (Summenkurve der Mortalität) verläuft wie die Abb. 2, jedoch ist der Abstand der Kurven nicht ganz so groß, was dem etwas schlechteren Gesamtergebnis entspricht. Das Phänomen der Frühsterblichkeit ist in dieser Abbildung wie auch in der Indexkurve der Mortalität nur angedeutet zu erkennen (Abb. 6). 24 Stunden nach der Infektion starben prozentual geringfügig mehr Kontroll- als Versuchstiere, erst nach 48 Stunden änderte sich das Verhältnis. Immerhin waren nach 48 Stunden alle geimpften Tiere eingegangen; dagegen wurde die Endmortalität der ungeimpften Tiere erst -wie auch im 1. Versuch- nach 72 Stunden erreicht.

3. Versuch: Ich begann diesen Versuch, der 546 Mäuse erfaßte, am 26.4.71. Er dauerte 37 Tage. Die Besonderheit im Vergleich zu den beiden vorhergehenden Versuchen lag darin, daß hier nicht in den "Immunisierungsblock" hinein infiziert wurde. Die 394 Versuchsmäuse wurden vielmehr alle zehnmal an aufeinanderfolgenden Tagen immunisiert und erst dann am 3., 5., 14., 17., 18., 19., 21. und 25. Tag nach dem Ende der Immunisierung intraperitoneal mit durchschnittlich $7,1 \times 10^8$ Keimen/ml infiziert. Die 152 nicht

Tabelle 3

Vers.- Tag	Zeile	Versuch		gestorben am					Kontrolle		gestorben am					WI	E
		lebend/ tot	Mort. %	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	lebend/ tot	Mort. %	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
3	1	50/4	8,0	4	-	-	-	-	51/28	54,9	24	4	-	-	-	85,4	> 1
5	2	50/6	12,0	6	-	-	-	-								78,1	> 1
14	3	49/6	12,2	6	-	-	-	-	51/34	66,7	26	8	-	-	-	81,7	> 1
17	4	50/2	4,0	-	2	-	-	-								94,0	> 1
18	5	50/3	6,0	2	1	-	-	-								91,0	> 1
19	6	50/2	4,0	2	-	-	-	-								94,0	> 1
21	7	46/5	10,9	-	4	1	-	-								83,7	> 1
25	8	49/14	28,6	9	5	-	-	-	50/28	56,0	26	2	-	-	-	48,9	< 1
Summe	9	394/42	10,7	29	12	1	-	-	152/90	59,2	76	14	-	-	-	81,9	3,8

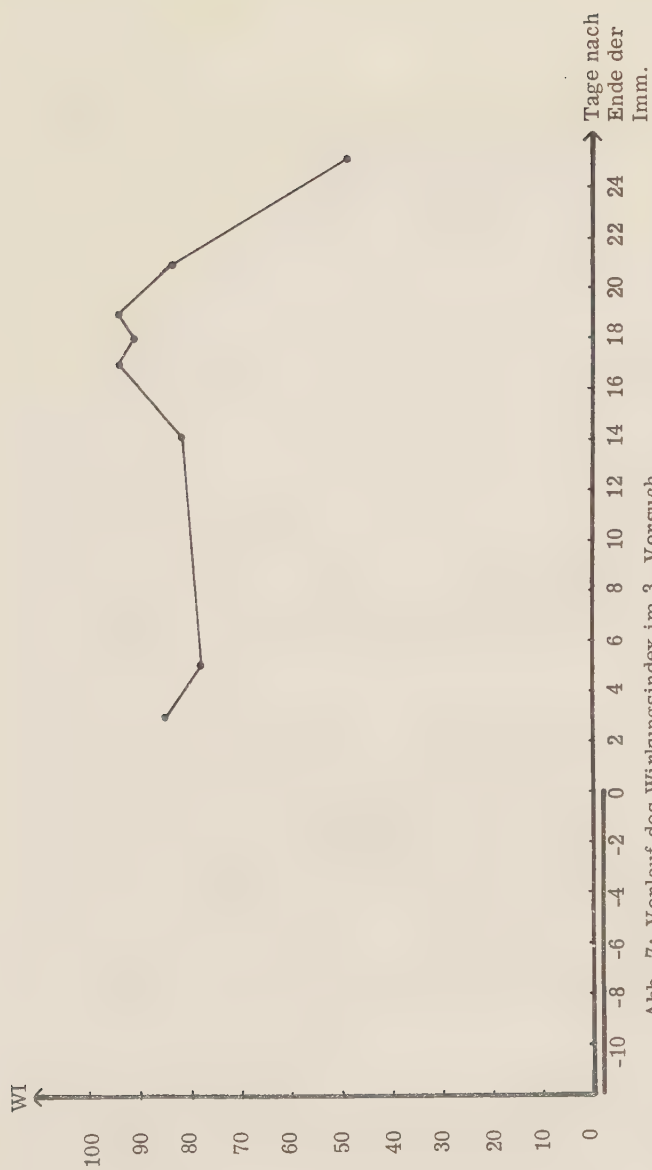
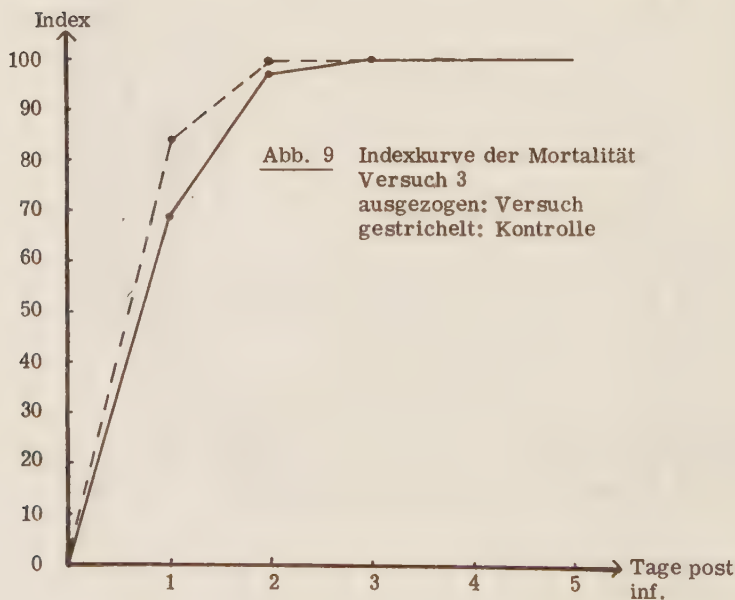
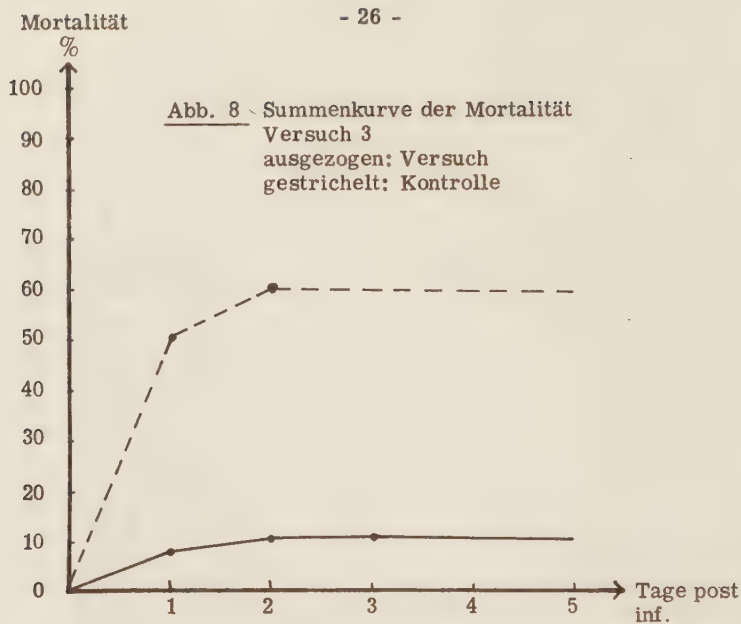


Abb. 7: Verlauf des Wirkungsindex im 3. Versuch
 Ordinate: Wirkungsindex; Abszisse: Tage nach Ende der Immunisierung
 Doppellinie: Immunisierungstage



immunisierten Kontrolltiere wurden am 3., 14. und 25. Tag belastet. Ich wollte mit diesem Versuch -und ebenso mit den folgenden Versuchen 5 und 6- neben dem eigentlichen Ziel dieser Arbeit versuchen, die jüngsten Arbeiten von WERNER, LEFEVRE und RAETTIG über die immunkompetenten Zellen durch Mortalitätsversuche zu bestätigen (48). In der Diskussion wird darauf näher eingegangen werden.

Tab.3, Spalte 15 zeigt, daß die guten Ergebnisse der ersten beiden Versuche auch hier durchweg (mit Ausnahme des 25. Tages) bestätigt wurden. Der Impfschutz war am besten am 17. bis 19. Tag, wo der Wirkungsindex zwischen 91 und 94 lag. Diese Ergebnisse waren alle signifikant (Spalte 16).

Gegenüber den Versuchen 1 und 2 fiel die Abweichung der Werte bei den Tieren auf, die am 5. Tag nach zehnmaliger Immunisierung infiziert wurden. In den ersten beiden Versuchen starben nur 2 % und 0 % der Versuchstiere, in diesem 3. Versuch dagegen 12 %.

Der 25. Tag des dritten Versuches nahm eine Sonderstellung ein, weil er mit einer Mortalität von 28,6% der Versuchstiere zu 56% der Kontrolltiere das schlechteste Ergebnis lieferte (Tab.3, Zeile 8). Entsprechend niedrig war der WI mit 48,9. Eine zu hohe Keimzahl konnte nicht die Ursache sein, denn die Mortalität der Nichtgeimpften, die mit demselben Infektionsmaterial belastet wurden, lag mit 56% eher an der unteren Grenze. Der Echtheitsgrad war kleiner als 1; damit war für diesen Versuchstag das Ergebnis nicht statistisch gesichert.

Das Gesamtergebnis dieses Versuches fiel zwar wiederum geringfügig schlechter aus als das der ersten beiden Versuche (Tab.3, Zeile 9), trotzdem darf man aber auch hier von einer guten Schutzwirkung gegenüber einer homologen E.coli-Infektion sprechen,

wie der WI von 81,9 beweist. E lag mit einem Wert von 3,8 weit über 1. Bei der Bewertung des Gesamtergebnisses muß man berücksichtigen, daß das etwas schlechtere Abschneiden im Vergleich zu den beiden ersten Versuchen weitgehend auf den ungünstig ausgefallenen Einzelversuch (Zeile 8) zurückgeführt werden muß.

Abb. 7 zeigt den Verlauf des Wirkungsindex während der Versuchsdauer. Man erkennt deutlich die große Schutzwirkung der Impfung mit dem Maximum am 17., 18. und 19. Tag und dem -recht steilen- Abfall bis zum 25. Tag nach Ende der Immunisierung.

Der Abstand der Kurven in Abb. 8 (ausgezogen=Versuch, gestrichelt=Kontrolle) entspricht der guten Schutzwirkung des Impfstoffes. Aus dieser Abbildung und aus der Abb. 9 ist zu entnehmen, daß das Phänomen der Frühsterblichkeit, das besonders im ersten Versuch hervortrat, hier nicht nachzuweisen war.

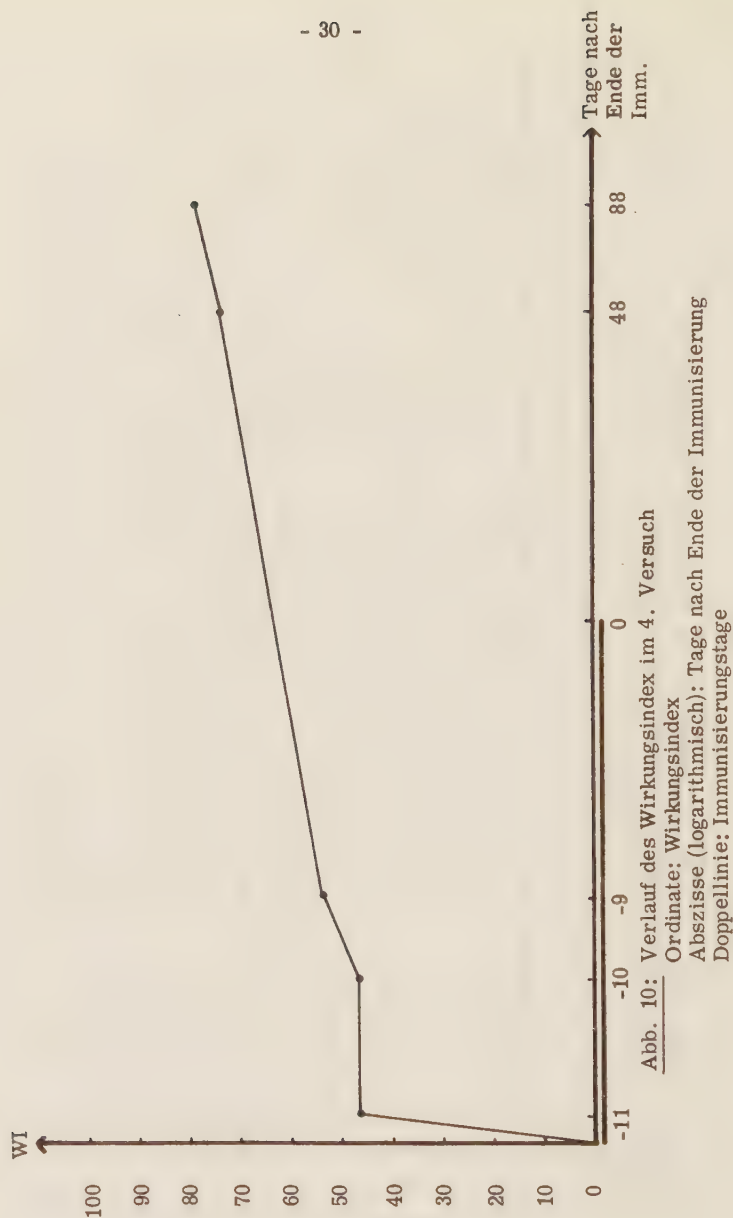
Aus der Indexkurve der Mortalität (Abb. 9) ist abzulesen, daß in diesem Versuch die immunisierten Versuchstiere deutlich verzögert starben. Während von ihnen am 1. Tag insgesamt 69%, am 2. Tag 28,6% und am 3. Tag 2,4% verendeten, erlagen die Kontrolltiere am 1. Tag zu 84,5% und am 2. Tag zu 15,5% der Infektion. Am 3. Tag starben keine Kontrolltiere mehr, ein Gegensatz besonders zum 1. Versuch.

4. Versuch: Für diesen 4. Versuch, der am 7.6.71 begann, benötigte ich 394 Mäuse. Er war mit einer Dauer von 100 Tagen der längste Versuch, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Der merkwürdige Versuchsaufbau läßt erkennen, daß zwei Ziele verfolgt wurden: Zum einen wollte ich zu ermitteln versuchen, wann der Impfschutz einsetzt, nachdem ja in den Versuchen 1 und 2 nach dreimaliger Immunisierung bereits ein durchaus

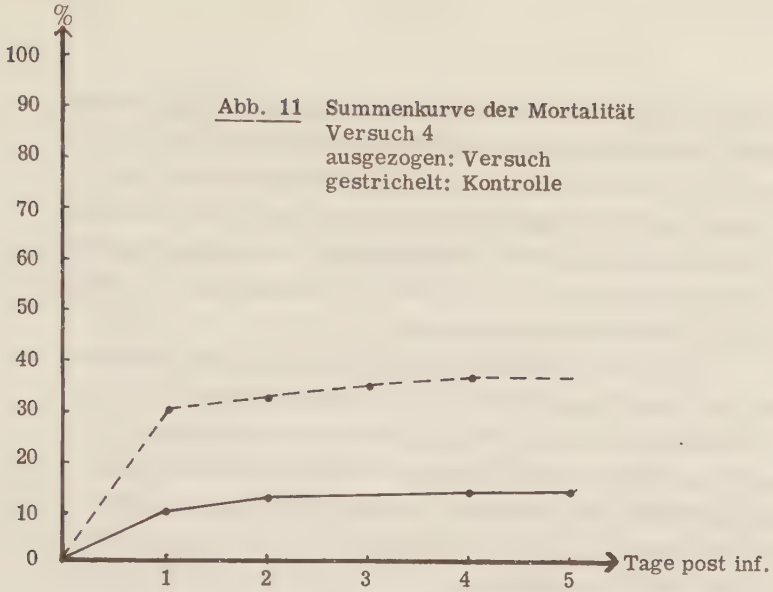
Tabelle 4

- 29 -

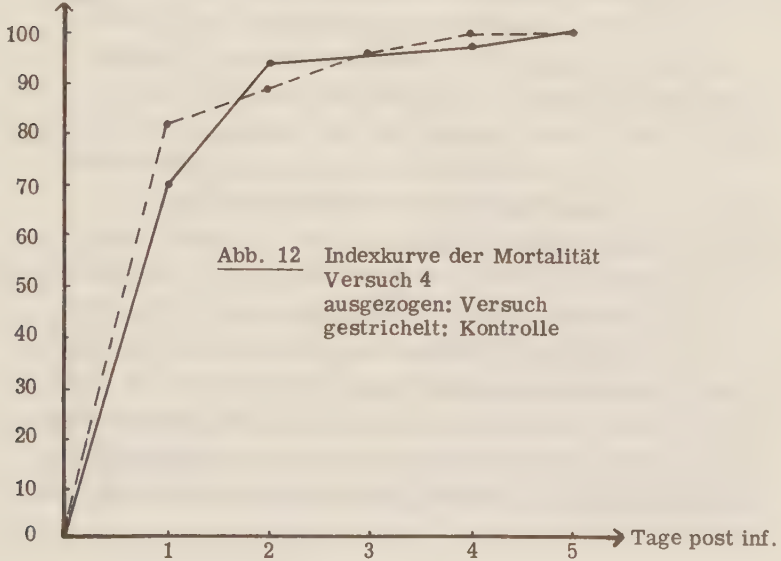
Vers.- Tag	Zeile	Versuch lebend/Mort. tot %	gestorben am 1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.					Kontrolle lebend/Mort. tot %	gestorben am 1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.					WI	E		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-11	1	50/8	16,0	6	2	-	-	-	50/15	30,0	13	1	1	-	-	46,7	<1
-10	2	50/8	16,0	6	1	-	-	1								46,7	<1
-9	3	50/7	14,0	3	4	-	-	-								53,3	<1
48	4	51/9	17,7	8	1	-	-	-	49/33	67,4	29	1	3	-	-	73,7	>1
88	5	46/1	2,2	-	-	-	1	-	48/5	10,4	1	2	-	2	-	78,9	<1
Summe	6	247/33	13,4	23	8	-	1	1	147/53	36,1	43	4	4	2	-	62,9	1,7



Mortalität



Index



belastbarer Impfschutz vorhanden war. Dementsprechend immunisierte ich im Frühteil des Versuches eine Tiergruppe einmal am -11. Tag und infizierte diese Gruppe 6 Stunden später, die 2. Gruppe (zweimal immunisiert) infizierte ich am -10. Tag wieder 6 Stunden nach der zweiten Immunisierung, und die letzte Gruppe (dreimal immunisiert) wurde am -9. Tag 6 Stunden nach der dritten Antigengabe intraperitoneal belastet.

Zum anderen war aus den vorausgegangenen Versuchen und aus der Arbeit von MOCHMANN (23) bekannt, daß der Impfschutz sehr lange anhält. Da lag es nahe, auch das andere Extrem zu prüfen und nachzusehen, wie lange im Mortalitätsversuch eine Schutzwirkung gegenüber einer homologen Infektion mit *E.coli*-Keimen nachweisbar blieb. Zwei weitere Mäusegruppen wurden also wie üblich durchimmunisiert, und dann prüfte ich am 48. und 88. Tag nach Ende der Immunisierung die Schutzwirkung der Impfung.

Die fünf Versuchsgruppen umfaßten zusammen 247 Mäuse, die restlichen 147 waren die Kontrolltiere, die am -11., am 48. und am 88. Tag infiziert wurden. Die Keimzahl des Infektionsmaterials betrug durchschnittlich $5,4 \times 10^8$ Keime/ml.

Tab. 4 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Im Frühteil (Zeilen 1-3) fällt zunächst die geringe Mortalität der Kontrolltiere auf. Von 50 infizierten Tieren starben nur 15 = 30%, was nicht auf die Keimzahl von hier $5,3 \times 10^8$ Keimen/ml zurückzuführen war. (Zum Vergleich: Im 2. Versuch infizierte ich die Kontrollen am -11. Tag mit $5,5 \times 10^8$ Keimen/ml und erzielte eine Mortalität von 54%). Es müssen also sicher andere Faktoren wie z. B. die Jahreszeit (RAETTIG vermutete schon früher einen Zusammenhang zwischen Jahreszeit und Impferfolg, 36) oder die unterschiedliche Anfälligkeit der Mäuse gegenüber Infektionen verantwortlich gemacht werden.

Aus der Tabelle 4 geht aber auch hervor, daß einer Mortalität von 30% bei den nicht immunisierten Tieren Mortalitäten von 14-16% bei den ein- bis dreimal immunisierten Tieren gegenüberstanden. Von diesen Tieren starben also überraschend etwa die Hälfte weniger als von den Kontrolltieren. Allerdings waren diese Ergebnisse statistisch nicht gesichert (Zeilen 1-3, Spalte 16).

Während der Impfschutz bei den Tieren, die 48 Tage nach Ende der Immunisierung infiziert wurden, mit einem WI von 73,7 im normalen Bereich lag und statistisch als einziges Ergebnis dieses Versuches gesichert war (Tab.4, Zeile 4), wurde der Wirkungsindex am 88.Tag noch etwas größer (Zeile 5). Jedoch ist auch dieses Resultat nicht signifikant, denn die Mortalitäten sowohl der Versuchs- als auch der Kontrolltiere lagen mit 2,2% und 10,4% ungewöhnlich niedrig. Möglicherweise spielte hier auch das Alter der Tiere eine Rolle, das zu diesem Zeitpunkt etwa 4 Monate betrug.

Das Gesamtergebnis des 4. Versuches geht aus der Zeile 6 der Tabelle 4 hervor. Einer Mortalität von nur 36,1% bei den Kontrollen stand eine Mortalität von 13,4% bei den Versuchstieren gegenüber; das entsprach einem WI von 62,9. Dieses Ergebnis war mit einem Echtheitsgrad von 1,7 statistisch signifikant.

Abb.10 zeigt den Verlauf des Wirkungsindex; dabei wurden die Tage nach Ende der Immunisierung auf der Abszisse logarithmisch aufgetragen. Die Aussage dieser Kurve allein ist nicht besonders groß, da ja außer den Anfangswerten und dem Endwert nur ein Zwischenwert (48.Tag) ermittelt wurde. Erst bei der Zusammenfassung der Ergebnisse aller Versuche kann eine Einordnung erfolgen, erkennbar ist jedoch der steile Anstieg des WI an den ersten drei Versuchstagen.

Wie aus dem Vergleich von Tab.4, Spalten 3-7 und 10-13 und aus den Abb.11 und 12 hervorgeht, starben die Tiere sowohl

im Versuch als auch bei der Kontrolle verzögert: Von den Versuchstieren gingen noch je eine Maus am 4. und 5. Tag post inf., und von den Kontrollmäusen auch noch zwei am 4. Tag post inf. ein.

Der Abstand der beiden Kurven (Abb.11) -Maß für die Schutzwirkung der Impfung- ist gering.

5. Versuch: Dieser Versuch, der am 30.8.71 begann und 30 Tage dauerte, wurde an 598 Mäusen durchgeführt. Außer der Verlaufskontrolle der Schutzwirkung der Impfung wollte ich mit ihm die Ergebnisse des Frühteiles des Versuches 4 zu reproduzieren versuchen. Ich führte hier außerdem eine 2. Infektion am -11. Tag ein und infizierte sowohl 6 als auch 12 Stunden nach einmaliger Immunisierung jeweils 50 Tiere. Die anderen Gruppen wurden am -10., -9., -1., 12., 14., 16. und 18. Tag nach Ende der Immunisierung mit 0,1 ml des Infektionsmaterials, das durchschnittlich $5,3 \times 10^8$ Keime/ml enthielt, belastet. Daneben wurden noch 150 Kontrolltiere ohne vorherige Impfung in drei Gruppen am -11., 12. und 18. Tag infiziert.

Tab.5 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Was den Frühteil betrifft (Zeilen 1-4), erreichte ich hier nicht die guten Schutzwerte des Versuches 4 mit 50%iger Senkung der Mortalität. Die Mortalität der Kontrollen war mehr als doppelt so groß wie im 4. Versuch (78,9% zu 30,0%), auch die der Versuchstiere lag wesentlich höher. Bemerkenswert war, daß am -11. Tag von den Tieren, die 12 Stunden nach der einmaligen Immunisierungsgabe infiziert wurden, mehr starben als von denjenigen, bei denen zwischen Immunisierung und Infektion nur 6 Stunden lagen (Tab.5, Zeilen 1 und 2). Erst am -10. Tag fiel die Mortalität der Versuchs-

Tabelle 5

Vers.- Tag	Zeile	Versuch					gestorben am					Kontrolle					gestorben am					WI	E
		lebend/ tot	Mort. %	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	lebend/ tot	Mort. %	10	11	12	13	14	15	16	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14								
-11 (6 h)	1	50/26	52,0	17	8	1	-	-	52/41	78,9	37	3	-	1	-						34,1	<1	
-11 (12 h)	2	50/35	70,0	24	10	1	-	-													11,3	<1	
-10	3	49/29	59,2	24	4	1	-	-													25,0	<1	
-9	4	50/13	26,0	11	2	-	-	-													67,1	>1	
-1	5	49/0	0	-	-	-	-	-													100,0	>1	
12	6	50/0	0	-	-	-	-	-	50/18	36,0	16	2	-	-	-						100,0	>1	
14	7	49/0	0	-	-	-	-	-													100,0	>1	
16	8	50/1	2,0	1	-	-	-	-													94,4	>1	
18	9	51/0	0	-	-	-	-	-	48/15	31,3	12	3	-	-	-						100,0	>1	
Summe	10	448/104	23,2	77	24	3	-	-	150/74	49,3	65	8	-	1	-						52,9	2,1	

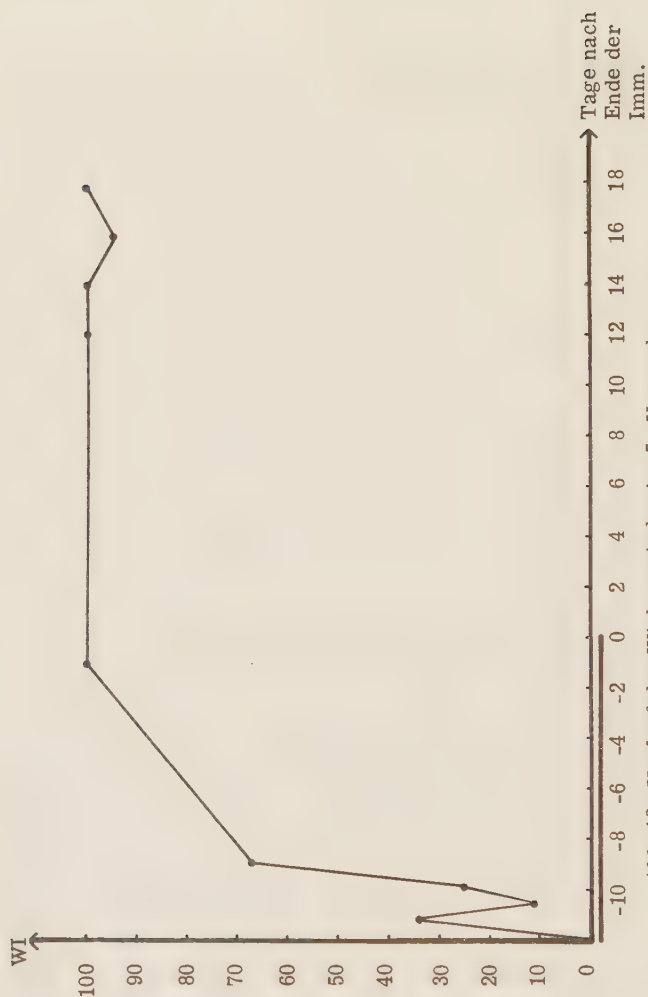
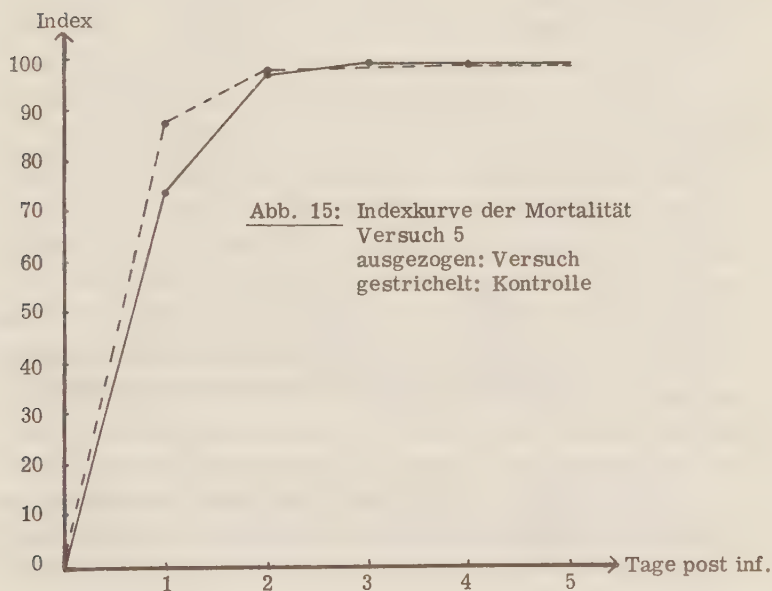
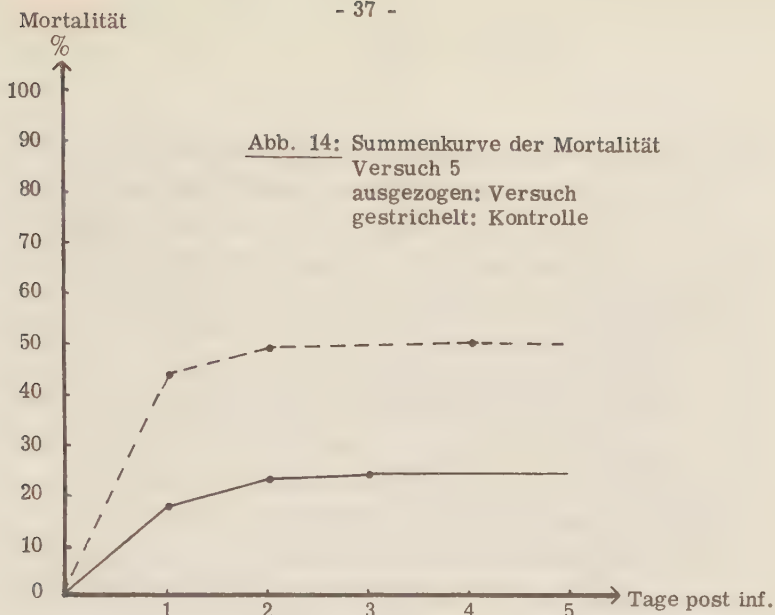


Abb. 13: Verlauf des Wirkungsindex im 5. Versuch

Ordinate: Wirkungsindex; Abszisse: Tage nach Ende der Immunisierung
Doppellinie: Immunisierungstage



tiere etwa auf den ersten Wert ab. Es bestand keine Signifikanz.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des 4. Versuches, bei dem -wenn statistisch auch nicht gesichert- immerhin eine Mortalitäts-senkung von ungefähr 50% der Versuchstiere zu den Kontrolltieren nachweisbar war, kann man aus Tab.5, Zeilen 1 bis 3 nur eine geringe Schutzwirkung ablesen.

Erst wenn die Tiere dreimal immunisiert und danach - am -9. Tag - infiziert wurden, kam es zu einer deutlichen Mortalitäts-senkung bei den Versuchstieren, die mit 26% schon in die Nähe des im 4. Versuch erhaltenen Wertes von 14% rückte (Zeile 4); der Wirkungsindex erreichte 67,1.

Überraschend war auch das Ergebnis, das ich am -1. Tag erzielen konnte (Zeile 5). Hier starb -wie auch in den Versuchen 1 und 2- keines der Versuchstiere an der intraperitonealen Infektion; der Wirkungsindex erreichte den Wert 100 bei E größer als 1.

Mit dem weiteren Verlauf dieses 5. Versuches war ich dann aber nicht mehr zufrieden. Die Mortalität der Kontrolltiere sank von 78,8% auf nur 31,3% am 18. Tag parallel zur Mortalität der Versuchstiere. Bis auf die Ausnahme am 16. Tag ging diese auf 0 zurück, und die Wirkungsindices stiegen auf 94,4 bzw. 100. Wenn auch alle Ergebnisse statistisch abgesichert werden konnten, vermochten sie doch wegen der zu geringen Mortalität der Kontrollen nicht zu befriedigen. Ich vermutete die Ursache des schlechten Infektionserfolges zunächst beim Infektionsmaterial selbst: die Keimzahl hätte zu niedrig sein können oder die Virulenz der Bakterien hätte nachgelassen haben können, eine Beobachtung, die schon früher trotz regelmäßiger Überimpfung und Tierpassagen gemacht wurde.

Deshalb infizierte ich an zwei Tagen jeweils 20 nicht geimpfte weiße Mäuse ungefähr gleichen Alters wie die Versuchsmäuse mit

demselben Infektionsmaterial, wie es für den Versuch benutzt wurde. Von beiden Tiergruppen starben jeweils 12 Tiere, was einer Mortalität von 60% entsprach. Die Keimzahl betrug einmal $4,7 \times 10^8$, das andere Mal 5×10^8 Keime/ml. Dieses Resultat legte den Schluß nahe, daß das Infektionsmaterial zumindest nicht allein die Schuld am schlechten Versuchsergebnis trug. Vermutlich waren auch die im Versuch befindlichen Mäuse aus irgendeinem Grund resistenter gegen eine Infektion mit Coli-Bakterien als die zusätzlich infizierten Tiere.

Tab. 5, Zeile 10 zeigt zusammenfassend das Ergebnis des 5. Versuches. Von 448 immunisierten Tieren erlagen 23,2% der Infektion, von 150 nicht immunisierten Kontrollen 49,3%. Der WI betrug 52,9; das Resultat war mit einem Echtheitsgrad von 2,1 signifikant.

Abb. 13 demonstriert den Verlauf des Wirkungsindex während des 5. Versuches. Der Schwankung am -11. Tag folgt ein steter Anstieg, bis das Maximum von 100 am -1. Tag erreicht und -bis auf den geringen Abfall am 16. Tag- beibehalten wird.

Abb. 14 verdeutlicht durch den geringeren Abstand der beiden Kurven für Versuchs- und Kontrolltiere, daß die Schutzwirkung der Impfung im Vergleich zu den Ergebnissen früherer Versuche (vergl. Abb. 2 und 5) nicht so gut war. Aber die beiden Kurven haben noch einen deutlichen Abstand voneinander, was den durchschnittlich noch guten Impferfolg (Tab. 5, Zeile 10) erkennen läßt. Nach Abb. 15 starben die Kontrolltiere schneller als die Versuchstiere.

6. Versuch: Dieser letzte Versuch begann am 4.10. und dauerte bis zum 2.11.71. 453 Versuchs- und 149 Kontrolltiere wurden mit durchschnittlich $6,2 \times 10^8$ Keimen/ml infiziert. Die Infektionstage

Tabelle 6

- 40 -

Vers.- Tag	Zeile	Versuch		gestorben am					gestorben am					WI	E		
		lebend/ tot	Mort. %	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.	1. 2. 3. 4. 5. Tag nach Inf.					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-11 (6 h)	1	50/24	48,0	15	8	1	-	-	50/35	70,0	32	3	-	-	-	31,4	<1
-11 (12 h)	2	50/28	56,0	20	8	-	-	-								20,0	<1
-10	3	50/20	40,0	17	2	1	-	-								42,9	>1
-9	4	50/12	24,0	10	2	-	-	-								65,7	>1
-1	5	50/2	4,0	-	2	-	-	-								94,3	>1
12	6	50/5	10,0	5	-	-	-	-	49/34	69,4	31	3	-	-	-	85,6	>1
14	7	50/7	14,0	4	2	1	-	-								79,8	>1
16	8	51/8	15,7	3	4	1	-	-								77,4	>1
18	9	52/13	25,0	12	1	-	-	-	50/39	78,0	36	3	-	-	-	68,0	>1
Summe	10	453/119	26,3	86	29	4	-	-	149/108	72,5	99	9	-	-	-	63,7	3,7

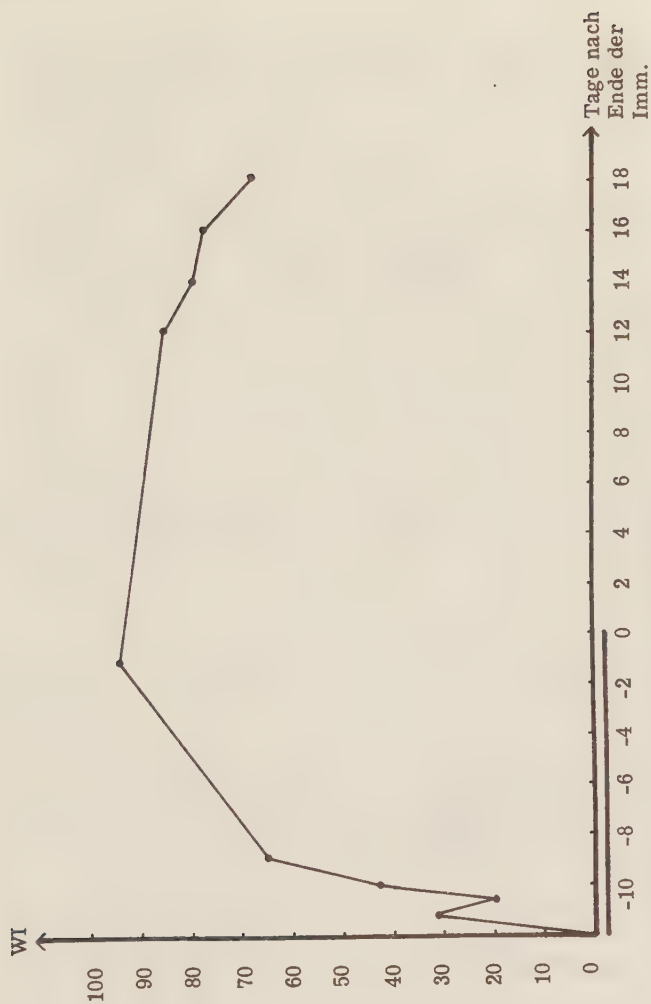
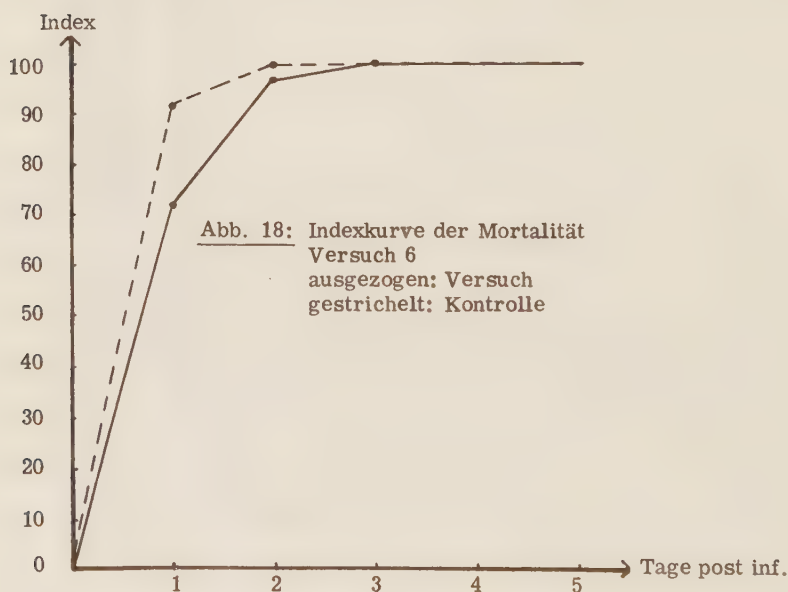
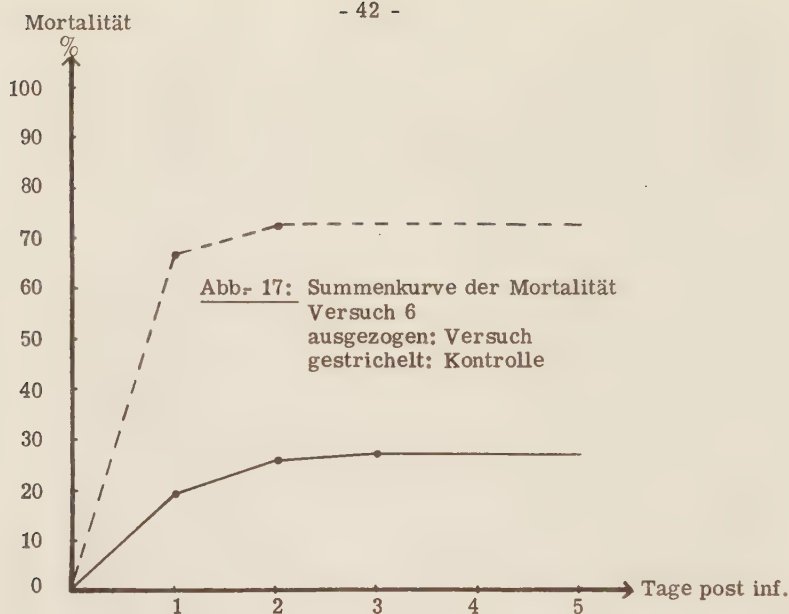


Abb. 16: Verlauf des Wirkungsindex im 6. Versuch
 Ordinate: Wirkungsindex; Abszisse: Tage nach Ende der Immunisierung
 Doppellinie: Immunisierungstage



entsprachen denen des 5. Versuches; die Virulenz der Bakterien wurde wegen der zu geringen Mortalität der Kontrolltiere im 5. Versuch durch zwei Tierpassagen erhöht.

Tab. 6 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Hervorzuheben ist zunächst, daß hier im Gegensatz zum Versuch 5 die Mortalität der Kontrollen fast konstant blieb und somit die Ergebnisse besser zu verwerten waren.

Wieder stellte ich fest, daß von den 12 Stunden nach der ersten Immunisierungsgabe infizierten Tieren mehr starben als von denen, die 6 Stunden nach der ersten Antigengabe belastet wurden (Tab. 6, Zeilen 1 und 2), wobei im Versuch 5 der Unterschied noch augenfälliger war. Am -10. Tag wurde -wie auch im 5. Versuch- annähernd wieder der erste Wert erreicht. Hier wurde auch im Gegensatz zu den ersten beiden Infektionen am -11. Tag E zum ersten Mal größer als 1; vom -10. Tag an waren alle Ergebnisse statistisch gesichert (Spalte 16).

Wie auch in den Versuchen vorher, läßt sich von -9. Tag ab eine gute Schutzwirkung der Impfung erkennen. Obwohl in der Diskussion noch darauf einzugehen sein wird, kann man an dieser Stelle schon feststellen, daß bereits eine dreimalige orale Immunisierung von Mäusen gegenüber einer intraperitonealen Belastung einen guten Schutz verleiht. Dabei ist besonders zu erwähnen, daß die Belastung direkt (6 Stunden) der letzten Immunisierung folgte.

Den sonst immer am -1. Tag erzielten und auch hier erwarteten Wirkungsindex von 100 erreichte ich in diesem Versuch nicht, sondern mußte mich mit einem WI von 94,3 "zufriedengeben". In den früheren Versuchen starb an diesem Infektionstag kein Tier; hier aber erlagen 2 Tiere der Infektionsbelastung. Man darf dies aber nicht überbewerten, denn die Virulenz des Infektionsmaterials

wurde soeben durch Tierpassagen erhöht. Der am -1. Tag erzielte Wirkungsindex war dennoch der für diesen Versuch höchste Schutzwert.

Die Zeile 10 der Tabelle 6 gibt das Gesamtergebnis des 6. Versuches wieder. Von 453 verschieden oft immunisierten Versuchstieren erlagen 119 (=26,3 %) der Infektion, von den 149 nicht immunisierten Kontrollmäusen aber 108 (=72,5 %). Daraus errechnet sich ein Wirkungsindex von 63,7 bei $E = 3,7$. Dieses Ergebnis ist also besser als das des 5. Versuches.

Abb. 16 zeigt den Verlauf des Wirkungsindex während des 6. Versuches. Wie aus Tab. 6, Spalte 15 hervorgeht, erreichte der WI nach der anfänglichen Schwankung und einem konstanten Anstieg schon während der ersten Immunisierungstage am -1. Tag sein Maximum, um dann langsam bis zum 18. Tag wieder abzufallen.

Abb. 17 verdeutlicht durch den Abstand der beiden Kurven den guten Schutzerfolg der Impfung in diesem Versuch. Man erkennt aus ihr und aus der Indexkurve der Mortalität (Abb. 18) die verzögerte Absterberate der Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Eine zusammenfassende Betrachtung aller Versuche ergibt folgendes. Die Tabelle 7 stellt die Gesamtergebnisse aller Versuche zusammen. Neben den Mortalitäten von Versuchs- und Kontrolltieren sind noch einmal der Wirkungsindex und der Echtheitsgrad der Summe jedes einzelnen Versuches angegeben (Spalten 7 und 8). Die Werte wurden den letzten Zeilen (Summen) der Tabellen 1 bis 6 entnommen.

Die Mortalität der Versuchstiere (Spalte 3) nahm von Versuch zu Versuch zu. Ein Grund dafür ist wohl in der Hereinnahme des "Frühteiles" (Infektion bereits nach ein- bis dreimaliger Immunisierung) in die Versuche 4 bis 6 zu suchen. Dementsprechend sank auch der Wirkungsindex - mit Ausnahme des 6. Versuches -

Tabelle 7

Versuch Nr.	Versuchstiere infixiert gestorben			Kontrolltiere infixiert gestorben			Wirkungs- index	Echtheits- grad
	n	n	%	n	n	%		
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	347	17	4,9	150	89	59,3	91,7	4,1
2	348	32	9,2	150	89	59,3	84,5	3,8
3	394	42	10,7	152	90	59,2	81,9	3,8
4	247	33	13,4	147	53	36,1	62,9	1,7
5	448	104	23,2	150	74	49,3	52,9	2,1
6	453	119	26,3	149	108	72,5	63,7	3,7
Summe	2237	347	15,5	898	503	56,0	72,3	7,0

WI

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

80
70
60
50
40
30
20
10
0

70
60
50
40
30
20
10
0

60
50
40
30
20
10
0

50
40
30
20
10
0

40
30
20
10
0

30
20
10
0

20
10
0

10
0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

Tage n.
Ende d.
Imm.

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

88
48
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10

Abb. 19: Verlaufskurve des Wirkungsindex nach Zusammenfassung aller Versuche

Punkte: Werte aus den Einzelversuchen

Ordinate: Wirkungsindex; Abszisse: Tage nach Ende der Immunisierung

Doppellinie: Immunisierungstage

ausgezogen: Verlauf

gestrichelt: Trend

stetig ab. Hervorzuheben ist noch die konstant gebliebene Mortalität der Kontrollen in den ersten drei Versuchen. Später kam es dann zu größeren Schwankungen (Spalte 6 der Tab. 7).

Alle gefundenen Ergebnisse waren signifikant und lagen mit E größer als 1 jenseits des Zufallsbereiches. Am besten schnitt auch hier wieder der Versuch 1 ab, bei dem ich einen Echtheitsgrad von 4,1 errechnete. Auch die Werte für E in den Versuchen 2, 3 und 5 waren hoch signifikant.

Die letzte Zeile der Tabelle 7 vermittelt das Gesamtergebnis aus allen Versuchen. Insgesamt verwendete ich 3135 Mäuse. 2237 wurden je nach Versuchsanordnung verschieden oft immunisiert. 898 Tiere waren nicht immunisierte Kontrollen. Von den immunisierten Versuchstieren starben insgesamt $347 = 15,5\%$, von den 898 nicht immunisierten Kontrollen erlagen 503 der intraperitonealen Belastung, das entsprach einer Mortalität von 56%. Der Wirkungsindex, errechnet aus allen Versuchen, betrug 72,3 bei einem Echtheitsgrad von 7,0. Das Gesamtergebnis ist also statistisch hoch signifikant.

Die Abbildung 19 veranschaulicht den Verlauf des Wirkungsindex während der gesamten Versuchsdauer durch Zusammenfassung aller ermittelten Werte. An etlichen Versuchstagen wurde der WI mehrfach bestimmt, d. h. derselbe Infektionstag kehrte in verschiedenen Versuchen wieder. Alle Werte wurden in die Abb. 19 eingetragen, die Mittelwerte wurden durch die ausgezogene Linie verbunden; die gestrichelte Linie zeigt den Trend.

Schon innerhalb der Immunisierungszeit kann man einen steilen Anstieg dieser Kurve erkennen, deren Maximum am -1. Tag noch in der Immunisierungsperiode liegt. Danach fällt die Kurve langsam bis zum 88. Tag nach Ende der Immunisierung ab, zeigt aber auch

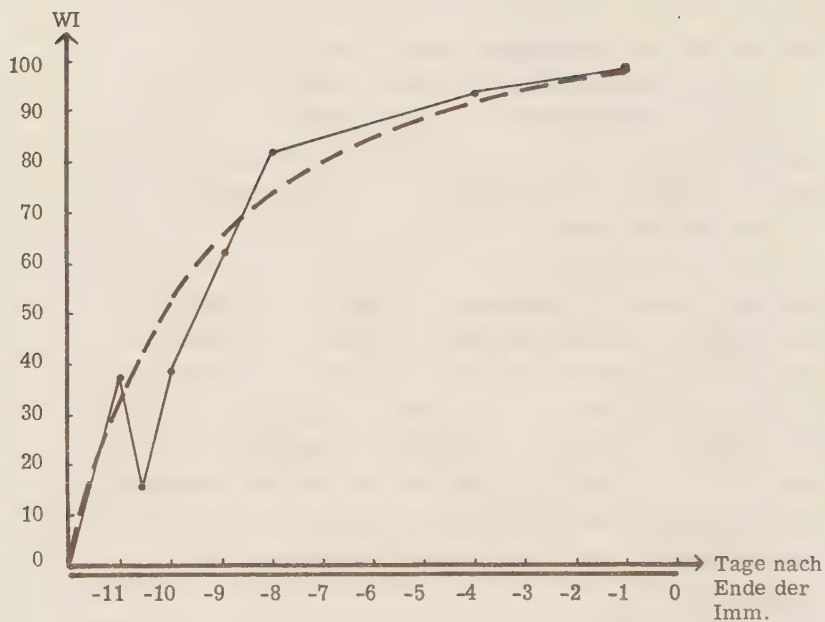


Abb. 20: Verlauf des Wirkungsindex während der Immunisierungszeit
Ordinate: Wirkungsindex
Abszisse: Tage nach Ende der Immunisierung
Doppellinie: Immunisierungszeit
ausgezogen: Verlauf
gestrichelt: Trend

an diesem Tag noch einen WI von über 70, was auf die selbst hier noch ausgezeichnete Schutzwirkung der oralen Impfung hinweist.

Innerhalb der Immunisierungszeit waren die Schwankungen der Wirkungsindices gering und wurden mit zunehmenden Alter der Mäuse, also mit sich vergrößerndem zeitlichen Abstand zur letzten Immunisierung, immer ausgeprägter. So fand ich zum Beispiel am -11. Tag bei den Tieren, die 6 Stunden nach nur einmaliger Immunisierung infiziert wurden, eine Differenz zwischen größtem und kleinstem Wirkungsindex von 15,3 und am -1. Tag gar nur von 5,7. Demgegenüber betrug dieser Unterschied am 14. Tag nach Ende der Immunisierung 37,1, am 18. Tag war er 32,1. Ich konnte diese Feststellung nicht weiter verfolgen, da der 18. Tag nach Ende der Immunisierung der letzte Tag war, der in mehreren Versuchen überprüft wurde.

RAETTIG hatte schon früher am Modell der *S. typhimurium*-Infektion der Maus dieselbe Beobachtung gemacht (38). Er führte die stärkere Streuung der Schutzwerte und der Mortalitäten auf eine Resistenzentwicklung der älteren Mäuse durch eine natürliche Immunisierung zurück.

Zur Verdeutlichung des steilen Anstiegs des WI während der Immunisierungszeit zeigt die Abb. 20 noch einmal einen Ausschnitt aus dem Beginn der Kurve in Abb. 19 unter Weglassung der Werte der Einzelversuche. Die größte Steigung der Kurve liegt im Anfangsteil während der ersten Antigengaben. Der Wirkungsindex erreichte schon am -9. Tag (dreimal immunisierte Tiere) den Wert 60 und überschritt am -8. Tag den Wert 80. Dieses Ergebnis wird in der Diskussion zu besprechen sein.

Diskussion

Vergleicht man das Gesamtergebnis aller Versuche, wie es die letzte Zeile der Tabelle 7 wiedergibt, mit den Untersuchungen anderer Autoren, so stellt man eine sehr gute Übereinstimmung fest. Ich erzielte bei den Versuchstieren eine Mortalität von 15,5% und bei den nicht immunisierten Kontrolltieren eine Mortalität von 56,0%. Das entsprach einem Wirkungsindex von 72,3 (vergl. Tab.7). LIETZ errechnete in seiner Arbeit einen Wirkungsindex von 73,6; bei ihm starben von 294 geimpften Mäusen 20,4%, von 294 nicht geimpften Kontrollmäusen aber 77,2% (15,16). RAETTIG und MARQUARDSEN erzielten in mehreren Versuchsreihen Wirkungsindices von 78,2, 60,4 und 72,1 (41).

MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeiter arbeiteten zunächst zweigleisig mit hitzeinaktiviertem Antigen und einem Natrium-desoxycholol-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Keimen. Dabei stellten sie keinen wesentlichen Unterschied zwischen diesen beiden verschieden behandelten Antigenen fest, so daß die Ergebnisse beider Antigenzubereitungen durchaus miteinander verglichen werden konnten (20,28). In ihren folgenden Versuchen verwendete diese Arbeitsgruppe daraufhin den Natriumdesoxycholol-Extrakt als Antigen, während die Arbeitsgruppe um RAETTIG das hitzeinaktivierte Antigen bevorzugte (12).

Die in zahlreichen Versuchsreihen erzielten Ergebnisse von MOCHMANN und OCKLITZ entsprechen den schon oben erwähnten Ergebnissen. Bei den mit dem Natriumdesoxycholol-Extrakt behandelten Tieren lag der Wirkungsindex einmal bei 73,5 (20), das andere Mal bei 81,0 (28). Wurde hitzeinaktiviertes Antigen zur Immunisierung der Mäuse verwendet, betrugen die Wirkungsindices 83,5 (20), 89,0 und 77,5 (28). Wegen der gleich guten Wirksamkeit der

beiden Antigenezubereitungen konnte auch einmal das Ergebnis aller Versuche mit oraler Immunisierung errechnet werden ohne Rücksicht darauf, ob die Mäuse mit dem Natriumdesoxycholat-Extrakt oder mit dem hitzeinaktivierten Antigen immunisiert wurden. Von 1461 immunisierten Versuchstieren erlagen hier 307 der homologen intraperitonealen Infektion, von derselben Anzahl unvorbehandelter Kontrolltiere aber 1177. Einer Mortalität von 21,0% der Versuchstiere stand also eine Mortalität von 80,6% der Kontrolltiere gegenüber. Das ergab einen Wirkungsindex von 74,0 (20).

Meine Ergebnisse stimmen also gut mit denen der anderen Autoren überein. Dabei ist noch nicht einmal berücksichtigt, daß sich meine Versuche über einen längeren Zeitraum erstreckten und daß ich außerdem auch schon -abweichend von den bisher zitierten Autoren- während der Immunisierungszeit infizierte.

Die oben aufgeführten Wirkungsindices beziehen sich nämlich alle auf das von RAETTIG angegebene Immunisierungsschema (38). Am Modell der *S. typhimurium*-Infektion der Maus wies RAETTIG nach, daß die Wirkung einer oralen Schutzimpfung dann am besten ist, wenn die Immunisierungsgesamtdosis auf viele Einzeldosen verteilt wird. Er forderte die zehnmalige Gabe eines Impfstoffes, der ungefähr 10^9 Keime/ml enthalten sollte, wobei jede Maus als Einzeldosis 0,25 ml dieses Impfstoffes an aufeinanderfolgenden Werktagen verfüttert bekommen sollte. Die Infektion erfolgte dann 10 bis 14 Tage nach der letzten Immunisierungsgabe.

Wie schon erwähnt, wich ich in meinen Versuchen von diesem Schema ab. Das Tierkollektiv bestand aus zwei großen Gruppen: Eine Gruppe wurde schon während der Immunisierungsperiode nach ein- bis achtmaliger Gabe des Impfstoffes infiziert; die andere Gruppe wurde -wie bisher üblich- vollständig zehnmal durchimmu-

nisiert, wobei dann jedoch der zeitliche Abstand zwischen dem letzten Immunisierungstag und dem Infektionstag variiert wurde.

An der Tatsache, daß meine Resultate dennoch so gut mit den anderen -unter anderen Bedingungen entstandenen- übereinstimmen, kann man ablesen, daß

1. die Schutzwirkung der Impfung über einen längeren Zeitraum anhalten muß und daß
2. die Wirkung der Impfung schnell einsetzen muß.

Es gibt nur die Arbeit von MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeitern, die sich mit der Dauer der Wirkung einer Schutzimpfung gegen eine Infektion mit Dyspepsiecoli-Keimen beschäftigt (23). Diese Autoren immunisierten weiße Mäuse zehnmal an aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Natriumdesoxycholat-Extrakt aus Dyspepsiecoli. Die einzelne Immunisierungsdosis entsprach $2,5 \times 10^9$ Keimen. Sie infizierten die Tiere dann homolog intraperitoneal, je eine Gruppe nach 7, 28, 56, 84 und 168 Tagen. Die entsprechenden errechneten Wirkungsindices waren nach der Reihenfolge der Infektion 55,8, 62,5, 62,5, 70,0 und 54,3. Meine Ergebnisse an den ungefähr korrespondierenden Tagen waren geringfügig besser, was aber nicht überbewertet werden darf.

Während das größte Intervall zwischen letztem Immunisierungstag und Infektion bei mir 88 Tage betrug, gingen OCKLITZ und MOCHMANN noch weiter. Sie infizierten eine weitere Tiergruppe am 168. Tag nach Ende der Immunisierung und erzielten noch einen Wirkungsindex von 54,3.

Zusammenfassend läßt sich bei Betrachtung beider Arbeiten also sagen, daß die Wirkung der Impfung gegen *Dyspepsiecoli* über einen langen Zeitraum anhält.

Serologische Untersuchungen führte ich im Gegensatz zu MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeitern nicht durch. Diese Autoren hatten sich schon früher zusammen mit HERING mit dem Nachweis von Serumantikörpern bei mit *Dyspepsiecoli*-Keimen immunisierten Mäusen beschäftigt (22, 29, 6) und dabei die Aussage von LIETZ und RAETTIG bekräftigt, daß nicht allein die Höhe des Antikörpertiters im Serum entscheidend zur Beurteilung des Impferfolges ist, sondern ganz besonders die Bereitschaft des immunkompetenten Systems, im Bedarfsfall rasch die erforderlichen Antikörper auszuscheiden (15, 16). An Stelle der indirekten Haemagglutinationsreaktion (22) hatten sie die empfindlichere gemischte Haemadsorptionsmethode angewandt (29, 6), dabei aber im Prinzip dieselben Resultate erhalten.

Mortalitätsversuche von dieser Dauer wurden mit *Salmonellen*, dem zweiten Modell der oralen Immunisierung, nicht durchgeführt, weil mit zunehmendem Alter der Mäuse auch ihre Resistenz immer größer wird (38). Ein direkter Vergleich zu den Versuchen mit DC-Keimen ist deshalb nicht möglich. RAETTIG und Mitarbeiter stellten jedoch fest, daß das Maximum des Impfschutzes nach zehnmaliger oraler Immunisierung und anschließender oraler Infektion mit virulenten *Salmonellen* zwischen dem 5. und 20. Tag liegt (38, 18). Zur Langzeituntersuchung des Impfschutzes immunisierten RAETTIG und BUSE weiße Mäuse wie üblich mit *S. typhi-murium* und infizierten sie oral nach 257 Tagen (40). Sie machten dabei die Feststellung, daß selbst nach dieser Zeit die Mäuse noch mit einem kräftigen Titeranstieg reagierten und schlossen daraus, daß die Tiere gegenüber einer homologen oralen Infektion auch nach langer Zeit noch

gut geschützt waren.

Das wichtigste Ergebnis meiner Arbeit war die Feststellung, daß der Wirkungsindex und damit die Wirksamkeit der Impfung schon während der zehnmaligen Immunisierungsperiode rasch anstieg, ja daß sogar das Maximum des Impfeffektes überhaupt noch innerhalb dieser Immunisierungszeit lag (vergl. dazu die Abb. 19 und 20). Die geringe Streubreite der einzelnen Versuchsergebnisse zu dieser Zeit zeigte auch, daß die überraschenden Ergebnisse nicht zufälliger Natur waren, sondern daß es sich um reproduzierbare Ergebnisse handelte.

Bei den Tieren, die am -11. Tag 6 Stunden bzw. 12 Stunden nach der Immunisierung infiziert wurden, sowie bei den Tieren, die am -10. Tag belastet wurden, vermochte das erreichte Ergebnis noch nicht ganz zu befriedigen, obwohl auch hier schon bemerkt werden konnte, daß stets deutlich mehr Kontroll- als Versuchstiere starben. Am -11. Tag und 12 Stunden nach der Immunisierung verendeten mehr Versuchstiere als 6 Stunden zuvor (vergl. Abb. 20; der WI sank). Möglicherweise liegt eine Erklärung darin, daß sich das Immunsystem zu diesem Zeitpunkt verstärkt mit den Antigenen auseinandersetzen mußte und nun zusätzlich noch mit virulenten Keimen belastet wurde.

Vom -9. Tag und dreimaliger Immunisierung an darf man aber bereits von einer guten Schutzwirkung der Impfung sprechen; der Wirkungsindex lag hier im Mittelwert schon über 60 und stieg bis zum -1. Tag weiter an. Wie die Abb. 20 zeigt, fand sich der steilste Anstieg des WI innerhalb der ersten 4 Tage. Wie sicher der Maximalwert am -1. Tag zu reproduzieren war, zeigte sich in der Wiederholung eines Wirkungsindex von 100 in drei von vier Versuchen.

Bereits PIRINGER immunisierte Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen und erzielte ein gutes Ergebnis, als er sie 12 Tage später infizierte (33).

Und jüngst senkten auch MOCHMANN und OCKLITZ die Zahl der Immunisierungen (24). Sie immunisierten vier Tiergruppen mit Natriumdesoxycholat-Extrakt, und zwar folgendermaßen: Gruppe 1 wurde fünfmal mit je 0,25 mg des Extraktes an aufeinanderfolgenden Tagen immunisiert, wobei 1mg des Extraktes einer Keimzahl von 1×10^{10} Keimen entsprach. Die Gruppe 2 wurde fünfmal mit 0,75 mg immunisiert; Gruppe 3 erhielt fünfmal 0,25 mg und als Booster nach 14 Tagen nochmals 1,25 mg; die 4. Gruppe wurde wie die Gruppe 3 immunisiert, erhielt aber zwei Boosterungen von je 0,625 mg 14 Tage nach der Grundimmunisierung bzw. 14 Tage nach der ersten Boosterung. Den weitaus besten Wirkungsindex zeigte nach der Infektion, die 40 Tage nach Ende der Grundimmunisierung intraperitoneal durchgeführt wurde, die 4. Gruppe.

Der Unterschied zwischen den oben angeführten Arbeiten und meinen Untersuchungen liegt im mehrtägigen Abstand zwischen letztem Immunisierungstag und Infektionstag. Aus dem Ergebnis meiner Versuche ist zu entnehmen, daß sich ein belastbarer Schutz bereits sehr schnell entwickelte, weil die Tiere ja im Gegensatz zu den Versuchsanordnungen der anderen Autoren nur Stunden nach der letzten Immunisierungsgabe infiziert wurden. Dieser Schutz wurde also bisher noch nicht in Anspruch genommen. Bemerkenswert ist auch, daß in meinen Versuchen keine Erhöhung der Immunisierungsdosis vorgenommen wurde.

Welcher Art ist nun aber dieser Schutz, der sich innerhalb der Immunisierungszeit als so eindrucksvoll erwies? Ist er spezifisch oder unspezifisch, humoral oder zellulär? Die Untersuchungen

einiger in der Einleitung genannter Autoren (39, 21, 42) können darauf keine Antwort geben, weil in der Versuchsanordnung mit fester Immunisierungszeit und mehrtägigem Intervall bis zur Infektion gearbeitet wurde.

Es ist allerdings schwer vorstellbar, daß der in meinen Versuchen nachgewiesene Schutz, der nach nur dreimaliger Immunisierung und nur wenige Stunden danach durchgeführter Belastung geprüft wurde, spezifischer Art sein könnte.

SCHULZE (46) berichtete kürzlich über die Steigerung der Phagozytoserate von Peritonealmakrophagen der weißen Maus nach oraler Immunisierung. Er immunisierte Mäuse mit Streptokokken (zur Feststellung des spezifischen Impferfolges) und Salmonellen (zur Feststellung des unspezifischen Impferfolges), und zwar jeweils vergleichend parenteral und oral.

In allen Versuchen erzielte SCHULZE eine fast gleich gute und signifikante Steigerung der Phagozytose im Vergleich zu den nicht immunisierten Kontrolltieren. Eine persönliche, noch nicht veröffentlichte Mitteilung von SCHULZE beinhaltet, daß auch eine Steigerung der Phagozytoserate sehr rasch nach Beginn der oralen Impfung auftrat. SCHULZE hatte also ein ähnliches Ergebnis im Phagozytostest, wie ich es im Mortalitätsversuch mit Dyspepsiecoli-Keimen erzielte.

Bei der Bedeutung der Makrophagen als erster Barriere des Organismus bei einer Infektion, liegt hier vermutlich die Erklärung für den guten Impfschutz in den ersten Immunisierungstagen; wahrscheinlich wurde er durch eine unspezifische zelluläre Frühreaktion verursacht, die durch den Antigenreiz der oralen Immunisierung stimuliert wurde. Eine weitere experimentelle Klärung dieser Vermutung sollte angestrebt werden.

Das gilt auch für eine weitere Vermutung: LIETZ schloß schon früher auf einen doppelten Schutz (15, 16) mit einer spezifischen und einer unspezifischen Komponente. Die Schutzwirkung der Impfung gegen Ende und nach der zehnmaligen Immunisierungsperiode war noch besser als die nach nur dreimaliger Immunisierung nachgewiesene, was nun die Ausbildung auch der spezifischen Komponente vermuten ließ.

Zusammenfassend würde dies bedeuten: Nach Ausbildung eines rasch belastbaren unspezifischen "Schnellschutzes" wurde ein spezifischer "Dauerschutz" aufgebaut, der -wie die eigenen Untersuchungen und die von MOCHMANN und OCKLITZ (23) zeigten- über längere Zeit nachweisbar blieb.

Wie schon in der Einleitung und bei der Besprechung der Versuchsergebnisse erwähnt, sollte in dieser Arbeit noch versucht werden, die Befunde von WERNER über die immunkompetenten IgM-bildenden Zellen im Mortalitätsversuch zu bestätigen (48). WERNER immunisierte Mäuse an zehn aufeinanderfolgenden Tagen mit Hammelerythrozyten oral und intravenös. An verschiedenen Tagen nach Ende der vollständigen Immunisierung untersuchte er Milz und Darm der getöteten Tiere mit der Agar-Plaque-Technik nach JERNE. Das für den Mortalitätsversuch wichtige Ergebnis war, daß nach oraler Immunisierung in der Lamina propria des Darmes am 7.Tag nach Ende der Immunisierung ein geringes, am 18.Tag ein hohes Maximum an plaquebildenden Zellen (pfc) auftrat.

Übertragen auf den Mortalitätsversuch, würde das bedeuten, daß einige Tage vor dem 18.Tag der Wirkungsindex abfallen müßte, um dann am 18.Tag wieder anzusteigen.

Die gestrichelte Kurve der Abb. 19 zeigt vor dem von WERNER geforderten 18. Tag keinen deutlichen Abfall des WI; das war das Ergebnis aus mehreren Einzelversuchen. Allenfalls am 25. Tag nach Ende der Immunisierung fand ich ein deutliches Minimum, das jedoch nur auf einem Einzelversuch beruhte, während ich die sonst in Frage kommenden Tage stets mehrfach prüfte.

Im Mortalitätsversuch konnte ich also WERNERs Ergebnisse nicht bestätigen.

Am Schluß der Diskussion soll noch ein Wort zum Phänomen der Frühsterblichkeit stehen, das von RAETTIG und KODES beschrieben wurde (36, 37, 12, 11). Man versteht darunter das schnellere Absterben der geimpften Tiere im Vergleich zum langsameren der Kontrollen.

Ich hatte gehofft, diesem Phänomen während der Versuche auf die Spur zu kommen. Betrachtet man daraufhin jedoch die Indexkurven der Mortalität, aus denen ja die Frühsterblichkeit am besten abzulesen ist, stellt man fest, daß sie nur im ersten Versuch ausgeprägt vorhanden war (vergl. Abb. 3). In allen anderen Versuchen kam sie nicht oder nur angedeutet vor, und deshalb war eine Analyse nicht möglich.

Ich kann hier nur die Feststellung von RAETTIG bestätigen, daß das Phänomen der Frühsterblichkeit bevorzugt dann auftritt, wenn das Impfresultat besonders gut ist (37). Auch mein erster Versuch hatte von allen das beste Ergebnis. Dabei starben fast alle Versuchstiere innerhalb von 24 Stunden. Die Entscheidung über Leben und Tod der Tiere schien hier besonders dramatisch zu verlaufen; entweder wurden die virulenten Bakterien ohne äußerlich sichtbare Reaktion toleriert oder die Versuchstiere erlagen der Infektion innerhalb weniger Stunden.

Zusammenfassung

Zehnmal mit Dyspepsiecoli-Bakterien oral immunisierte weiße Mäuse sind gegenüber einer homologen intraperitonealen Infektion hochgradig und langdauernd geschützt.

Bereits nach der dritten oralen Antigengabe ist ein signifikanter Infektionsschutz nachweisbar. 6 Stunden nach der ersten Impfung ist schon ein Anstieg der Kurve für den Wirkungsindex erkennbar.

In der Diskussion wird als Ursache dieses unerwarteten Schutzes eine unspezifische zelluläre Frühreaktion angenommen.

Literatur

1. BESREDKA, A. Die lokale Immunisierung
Leipzig 1926
2. BREUEL, H.-P. Lokale Immunisierung
Stuttgart 1969
3. BISPING, W. Versuche zur oralen Immunisierung von Hühnern mit hitzeinaktivierter Salmonella-Vakzine
1. Mitteilung: Impf- und Infektionsversuche an Hühnerküken
Zbl. Vet. Med. B 18, 306-311 (1971)
4. CRABBE, P.A.
NASH, D.R.
BAZIN, H.
EYSEN, H.
HEREMANS, J.F. Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germfree mice after oral or parental immunisation with ferritin
J. exp. Med. 130, 723 (1969)
5. DIMITRIADIS, I.
BISPING, W. Versuche zur oralen Immunisierung von Hühnern mit hitzeinaktivierter Salmonella-Vakzine
2. Mitteilung: Serologische Untersuchungen zum Auftreten von Antikörpern und eines "booster"-Effektes
Zbl. Vet. Med. B 18 (1971)
6. HERING, L.
MOCHMANN, H. Der Nachweis von Antikörpern gegen Dyspepsiecoli-Bakterien mit dem Verfahren der gemischten Haemadsorptionsreaktion nach FAGRAEUS
Zschr. f. Immunitätsforschung, Allergie und klinische Immunologie 136, 440-450 (1968)

- Zbl.f. Bakt.Hyg. I. Abt. Orig. A 217,
242-253 (1971)
13. LEFEVRE, H. Vergleichende Untersuchung der
PICHL, H. Intestinalantikörper nach oraler
WERNER, H.-J. oder intraperitonealer Immuni-
WIENER, A. sierung von Mäusen mit Hammel-
LISSY, A. erythrozyten
Zbl.f. Bakt.Hyg. I. Abt. Orig.
A 217, 529-539 (1971)
14. LEMKE, H. Vergleichende Untersuchungen über
die "natürlichen" Antikörper und
die orale Immunisierung gegen
Typhus und Paratyphus beim
Menschen und gegen Salmonella
typhi-murium bei Kälbern
Inaug. Diss. Kiel 1968
15. LIETZ, B. Orale Impfung mit inaktivierten
Dyspepsiecoli-Bakterien bei
Mensch und Tier
Inaug. Diss. FU Berlin 1969
16. LIETZ, B. Orale Immunisierung mit nicht-
RAETTIG, H. vermehrungsfähigen Mikroorga-
nismen oder ihren Antigenen
5. Mitteilung: Tierversuche zur
Schutzimpfung gegen Dyspepsie-
coli-Infektionen
Zbl.f. Bakt.I. Orig. 204, 543-554
(1967)
17. MARWIK, G. Tierversuche zur Inhalations-
impfung mit inaktivierten S.typhi-
murium-Bakterien
Inaug. Diss. FU Berlin 1966

18. MARWIK, G.
SCHMUDDE, R.
NEUMANN-SCHÖNWETTER, B.
RAETTIG, H.
- Orale Immunisierung mit nicht-vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
8. Mitteilung: Vergleichende Tierversuche zur Inhalationsimpfung und zur nasalen, oralen und rektalen Schutzimpfung
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 208, 26-37 (1968)
19. MEVES, M.
- Aufnahme und Verteilung von radiomarkiertem Antigen von S. typhi-murium in der Maus bei oraler, rektaler und subkutaner Anwendung
Inaug.Diss. FU Berlin 1966
20. MOCHMANN, H.
OCKLITZ, H.W.
SCHMIDT, E.F.
HERING, L.
MILLECK, J.
- Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-desoxychol-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen
3. Mitteilung: Die Schutzwirkung des Extraktes im aktiven Mäuseschutzversuch
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 203, 314-325 (1967)
21. MOCHMANN, H.
OCKLITZ, H.W.
HERING, L.
SCHMIDT, E.F.
RICHTER, U.
- Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-desoxychol-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen
5. Mitteilung: Die Gruppenspezifität der Schutzwirkung und der Schutzeffekt einer bivalenten Immunisierung im aktiven Mäuseschutzversuch
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 206, 63-71 (1968)

22. MOCHMANN, H.
OCKLITZ, H.W.
SCHMIDT, E.F.
RICHTER, U.
HERING, L.
- Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen
7. Mitteilung: Serumantikörper in der indirekten Haemagglutinationsreaktion bei immunisierten und belasteten Mäusen
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 208, 58-69 (1968)
23. MOCHMANN, H.
OCKLITZ, H.W.
HERING, L.
SCHMIDT, E.F.
RICHTER, U.
- Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen
9. Mitteilung: Die Dauer des mit dem Extrakt im aktiven Mäuseschutztest erzielten Schutzes
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 209, 325-331 (1969)
24. MOCHMANN, H.
OCKLITZ, H.W.
HERING, L.
SCHMIDT, E.F.
RICHTER, U.
- Der Einfluß der Dosierung und des Booster-Reizes auf die Wirksamkeit der oralen Immunisierung gegen Dyspepsiecoli-Infektionen im aktiven Mäuseschutzversuch
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 216, 24-31 (1971)
25. MOCHMANN, H.
OCKLITZ, H.W.
SCHMIDT, E.F.
SCHMITZ, H.H.
- Die Oralimmunisierung von Neugeborenen mit einem Extraktimpfstoff aus Dyspepsiecoli- ein Feldversuch
1. Mitteilung: Herstellung und Prüfung des Impfstoffes
Pädiatrie und Grenzgebiete
Band 8, Heft 1 (1969)

26. NASH, D.R.
CRABBE, P.A.
BAZIN, H.
EYSEN, H.
HEREMANS, J.F. Specific and non-specific immuno-
globulin synthesis in germfree
mice immunized with ferritin
by different routes
Experientia 25, 1094 (1969)
27. NEUMANN-SCHÖN-
WETTER, B. Die lokale Immunisierung mit
inaktiviertem Poliomyelitisvirus
Inaug. Diss. FU Berlin 1968
28. OCKLITZ, H.W.
MOCHMANN, H.
MILLECK, J.
HERING, L.
SCHMIDT, E.F. Laboratoriumsversuche über die
Möglichkeiten einer oralen Immu-
nisierung mit einem Natrium-
desoxycholat-Extrakt aus Dys-
pepsiecoli-Stämmen
4. Mitteilung: Der Schutzeffekt
verschiedener Zellpräparationen
aus Dyspepsiecoli-Keimen im
Vergleich zur Schutzwirkung des
Natriumdesoxycholat-Extraktes
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 205, 502-509
(1968)
29. OCKLITZ, H.W.
MOCHMANN, H.
HERING, L.
SCHMIDT, E.F.
RICHTER, U. Laboratoriumsversuche über die
Möglichkeiten einer oralen Immu-
nisierung mit einem Natrium-
desoxycholat-Extrakt aus Dys-
pepsiecoli-Stämmen
8. Mitteilung: Serumantikörper
in der gemischten Haemadsorp-
tionsreaktion nach FAGRAEUS bei
immunisierten und belasteten
Mäusen
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 209, 161-168
(1969)
30. OCKLITZ, H.W.
MOCHMANN, H.
SCHMITZ, H.H.
SCHMIDT, E.F. Die Oralimmunisierung von Neuge-
borenen mit einem Extraktimpfstoff
aus Dyspepsiecoli- ein Feldversuch
2. Mitteilung: Organisation und

Durchführung des Feldversuchs
Pädiatrie und Grenzgebiete
Band 8, 13-27 (1969)

31. OCKLITZ, H.W.
MOCHMANN, H.
SCHMIDT, E.F. Die Prophylaxe der Dyspepsie-
coli-Infektion
Das Deutsche Gesundheitswesen
26, 1226-1235 (1968)
32. PETER, A. Beobachtungen über parenterales
Auftreten oral verabfolgter füt-
terungsapathogener Mikroorganismen
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 201, 85-90
(1966)
33. PIRINGER, W.A. Orale Immunisierung weißer
Mäuse durch Dyspepsiecoli
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 196, 463-468
(1965)
34. RAETTIG, H. Bundesgesundheitsblatt 10, 229
(1967)
35. RAETTIG, H. Zbl.f. Bakt. I. Ref. 210, 465 (1968)
36. RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht-
vermehrungsfähigen Mikroorga-
nismen oder ihren Antigenen
1. Mitteilung: Der Grundversuch
zur Schutzimpfung der Maus gegen
eine Enteritis-Infektion
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 193, 398-410
(1964)

37. RAETTIG, H.

Orale Immunisierung mit nicht-vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
2. Mitteilung: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Maus
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 197, 368-388 (1965)

38. RAETTIG, H.

Orale Immunisierung mit nicht-vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
3. Mitteilung: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 203, 478-491 (1966)

39. RAETTIG, H.
BUSE, A.

Orale Immunisierung mit nicht-vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
4. Mitteilung: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 204, 221-231 (1967)

40. RAETTIG, H.
BUSE, A.

Orale Immunisierung mit nicht-vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
10. Mitteilung: Serologische Primär- und Sekundärantwort nach oraler Impfung mit *S. typhimurium*-Vollantigen im vergleichenden Tierexperiment
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 214, 216-230 (1970)

41. RAETTIG, H.
MARQUARDSEN, A. Orale Immunisierung mit nicht-
vermehrungsfähigen Mikroorga-
nismen oder ihren Antigenen
11. Mitteilung: Wirksamkeit
von Kombinationsimpfstoffen aus
Enterobacteriaceen-Vollantigen
im Mäuseschutztest
Zbl.f. Bakt. I. Abt. Orig. 215,
296-315 (1970)
42. ROSSETINI, M. O.
LEVANON, Y.
RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht-
vermehrungsfähigen Mikroorga-
nismen oder ihren Antigenen
7. Mitteilung: Nachweis von Rea-
ginen im Serum und in Dünndarm-
zellen oral geimpfter Laboratoriums-
tiere
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 208, 16-26 (1968)
43. ROWLEY, D. Rapidly induced changes in the
level of nonspecific immunity in
laboratory animals
Brit. J. exp. Path. 37, 223-234 (1956)
44. SCHMUDDE, R. Vergleichende, orale, nasale und
rektale Impfung von Mäusen mit
inaktivierten S. typhi-murium-
Bakterien mit und ohne Dimethyl-
sulfoxyd-Zugabe
Inaug. Diss. FU Berlin 1968
45. SCHREIBER, K. A. Ein Feldversuch zur oralen Impfung
mit inaktivierten Dyspepsiecoli-
Bakterien im Säuglings- und Klein-
kindesalter
Inaug. Diss. FU Berlin 1968

46. SCHULZE, H. J. Einfluß der oralen Immunisierung
auf die Phagozytosefähigkeit
von Peritonealmakrophagen
der Maus
Inaug.Diss. FU Berlin 1972
47. UECKER, W. Orale Immunisierung mit nicht-
MEVES, M. vermehrungsfähigen Mikroorga-
RAETTIG, H. nismen oder ihren Antigenen
6. Mitteilung: Tierversuche zur
Resorption und Sekretion von
radiomarkiertem bakteriellen Antigen
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 208, 2-15 (1968)
48. WERNER, H. -J. Biphasic occurrence of IgM-forming
LEFEVRE, H. cells in the intestine after oral
RAETTIG, H. Immunisation Nature 232, 119-120
(1971)

Ich danke Herrn Professor Raettig
für die Überlassung des Themas
und die Unterstützung bei der
Erstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Ingrid
Schubert für ihre Hilfe bei der
Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Ich wurde am 20. November 1945 als Sohn des Arztes Dr. Rudolf Steffen und seiner Ehefrau Herta, geb. Freund, in Hemer-Westig geboren. Ab 1952 besuchte ich die Volksschule in Hemer-Westig und wechselte dann auf das Märkische Gymnasium in Iserlohn über, wo ich 1966 das Abitur ablegte. Seit dem Sommersemester 1966 studierte ich Humanmedizin an der Freien Universität Berlin. Am 1.3. 1973 bestand ich dort das Staatsexamen.

